

03062

rej. 7

**"Entamoeba histolytica: Síntesis de Proteína y Traducción
de Acido Ribonucleico Mensajero In Vitro"**

Tesis presentada en el Instituto de Investigaciones
Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México
como requisito necesario para la obtención del grado de:

Maestría en Investigación Biomédica Básica (Inmunología)

por

Felipe Mendoza Pérez

México, D.F.

Abril 1987

**TESIS CON
FALLA EN ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS:	15
I. Extracción de RNA	15
II. Cinética de Incorporación de RNA total	15
III. Actividad de mRNA en <u>E. histolytica</u> y Laredo	15
IV. Biosíntesis de Proteínas por <u>E. histolytica</u> (HM1:IMSS y HK9:NIH) y <u>Laredo</u> - Durante la Curva de Crecimiento.	16
V. Síntesis de Proteínas Durante la Curva de Crecimiento	17
VI. Inmunodetección de Productos de Traducción con Sueros de Pacientes con Amibiasis Hepática.	17
VII. Reconocimiento de Proteínas por un Monoclonal anti- <u>E. histolytica</u>	18
VIII. Inmunodetección de Productos de Traducción con un Anticuerpo Monoclonal.	18
DISCUSION	20
BIBLIOGRAFIA	25

INTRODUCCION

La amibiasis es una infección producida por el parásito Entamoeba histolytica, y representa un problema de salud pública a nivel mundial (1). En algunas áreas geográficas - tales como México, Venezuela y otros países, la enfermedad es endémica, por esta razón resulta importante tanto su diagnóstico como su prevención (2,3 y 4).

Se han estudiado muchos aspectos de la E. histolytica, entre los cuales destacan: mecanismos de patogenicidad, relación hospedero-parásito, caracterización de antígenos que tengan importancia en el desarrollo de inmunidad protectora o en el diagnóstico de la enfermedad, o bien que permitan distinguir entre cepas patógenas y no patógenas, y por último factores que contribuyen a la virulencia de la amiba (5, 6,7,8,9 y 10).

Uno de los aspectos centrales para el desarrollo de inmunidad protectora contra E. histolytica es la posibilidad de contar con un antígeno(s) adecuado(s). Para lograr tal fin se han efectuado diversos estudios con el objeto de determinar las características antigénicas, naturaleza bioquímica y grado de protección de diferentes fracciones obtenidas a partir de homogenados y extractos totales de amiba, las cuales constituyen las preparaciones más frecuentemente usadas para el serodiagnóstico e inmunización (6,11 12,13 y 14). Con menor frecuencia se han utilizado preparaciones semipurificadas a través de cromatografía en columna o bien por centrifugación diferencial (15-18). Sin embargo, el estudio de antígenos con efectos de protección o para fines diagnósticos es difícil, entre otras causas por el complejo patrón antigénico de este parásito tal y como lo demuestran algunos estudios, como por ejemplo el de Chang y col. (11) el cual detectó al menos 32 componentes antigéni-

cos usando un extracto soluble de la cepa HT31 por medio de la técnica de inmunoelectroforesis bidimensional.

Otro factor que complica este tipo de análisis se deriva de la observación de Ishaq y Padma (14), quienes sugieren que las cepas de E. histolytica tienen más antígenos específicos de cepa que antígenos en común, ya que en tres cepas de amibas aisladas a partir de pacientes con colitis amibiana aguda y colitis amibiana no disintérica, se encontraron solo dos antígenos compartidos, mientras que algunos otros solo estaban presentes en una o dos de ellas.

Goldman y col. (12) sugieren la presencia de antígenos específicos de cepa basado en un estudio que realizaron en 6 cepas de amibas no histolyticas y 8 cepas aisladas a partir de infecciones en humanos. Con ellas hicieron análisis antigénicos por medio de fluorescencia directa e inhibición de la fluorescencia, utilizando el suero de un paciente con amibiasis invasora. Con este suero observaron diferencias en el índice de fluorescencia entre las cepas no histolyticas y aquellas aisladas a partir de infecciones, lo cual indica diferencias antigénicas entre estos dos grupos. Por otra parte con este mismo ensayo se observaron diferencias en la fluorescencia entre las cepas histolyticas, por lo que los autores concluyen que estas deben tener los mismos antígenos en proporciones más o menos similares, observandose solo diferencias cuantitativas. Con los experimentos de inhibición de la fluorescencia se observan diferencias antigénicas aún más claras entre los dos tipos de amibas utilizadas, coincidiendo con los resultados de inmunofluorescencia directa.

Entre los primeros estudios que determinaron algunas de las propiedades de los antígenos de amiba está el de Ali Khan y col. (16 y 17) quienes utilizaron un extracto soluble de E. histolytica en cultivo monoxénico, con el cual obtuvo por cromatografía, tres fracciones que caracterizó bioquími-

camente. De estas fracciones, las dos primeras contenían los componentes de alto peso molecular (F_1 y F_2), que por isoelectroenfoque demuestran ser una mezcla de proteínas ácidas y ligeramente básicas. Diferentes estudios inmunológicos tales como fijación de complemento y hemaglutinación, demostraron que la casi totalidad de estas actividades se encuentran en las fracciones F_1 y F_2 . A través de doble inmunodifusión e inmunoelectroforesis se observó un patrón similar entre el extracto crudo y las diferentes fracciones probadas. En conjunto los trabajos mencionados sugieren que el estudio de antígenos puede complicarse por el hecho de que los diferentes grupos de investigación trabajen con distintas cepas; asimismo no existe un método de extracción uniforme y además se han usado una gran gama de inhibidores enzimáticos a concentraciones variables. A pesar de esta problemática la mayoría de los investigadores obtienen por medio de cromatografía en columna de extractos solubles de tres a cuatro picos de separación.

A partir de la introducción por Diamond (19,20 y 21) de un medio de cultivo axénico para el desarrollo de E. histolytica se han podido estudiar los antígenos del parásito libres de moléculas contaminantes provenientes de otros microorganismos y así se han definido algunas de sus características bioquímicas y sus propiedades inmunológicas. Esto se ejemplifica con los estudios de Sanchez y col. (22) y los de Krupp (7 y 23); los primeros identifican diez antígenos por inmunoelectroforesis y diecinueve por inmunoelectroforesis cruzada. Al pasar su extracto por Sefadex obtienen una fracción A con tres antígenos y fracciones B y C con el mayor número de antígenos; cuando se recromatografía la fracción A obtienen dos subfracciones, de las cuales A_1 tiene un solo componente. Sin embargo en este estudio, las fracciones obtenidas no fueron ensayadas por métodos inmunológicos. Por otra parte Krupp (7) trata de correlacionar el título de he-

maglutinación, el patrón inmunolectroforético y el nivel de protección inducida en hamsters con tres de las cuatro fracciones obtenidas por cromatografía a partir de un extracto soluble de trofozoitos, después de un desafío de amibas. De estas la fracción 1 es la que da el mayor grado de protección con un título variable de hemaglutinación (1:243 a 1: 59,049) y un patrón inmunolectroforético similar al obtenido con el antígeno total, sin embargo este último demuestra ser menos eficiente para conferir protección en hamsters. Con las otras tres fracciones se obtuvo una menor protección y títulos variables de hemaglutinación. Este estudio demuestra que los títulos de hemaglutinación y la complejidad del patrón inmunolectroforético no correlacionan con el grado de protección obtenida con las fracciones debido a que la respuesta individual es muy heterogénea.

Recientemente se le ha dado importancia a los componentes de superficie de E. histolytica, ya que algunas propiedades que parecen caracterizar a las cepas patógenas pueden ser mediadas por estos componentes. Entre estas propiedades encontramos la adhesión a células epiteliales (24), la susceptibilidad de las amibas para ser aglutinadas por la concanavalina A (25) y la capacidad para producir efectos líticos en cultivos de células de mamíferos (26). Por otra parte los componentes de superficie son los que interactúan primariamente con el sistema inmune del hospedero durante el proceso infeccioso, por lo que es probable que estén implicados en la inducción o evasión de la respuesta inmune del organismo. En este sentido, poco se ha hecho para tratar de caracterizar los componentes de superficie; entre los estudios existentes se encuentra el de Acosta y col. (27) quienes obtienen seis componentes de superficie de Entamoeba invadens, con pesos moleculares que van desde 14 a 67 kDa, siendo el componente de 67 kDa el de mayor densidad; de éstos, 3 son glucoproteínas (24,60 y 67 kDa). Por otro lado,

Jiménez (28) y Calderón (29) han aislado 5 y 6 componentes de superficie de E. histolytica respectivamente, esta diferencia se puede deber a la metodología empleada. Estos componentes precipitan con sueros de pacientes con amibiasis hepática por la técnica de doble inmunodifusión.

Aley y col. (30) purificaron los componentes de membrana externa, usando durante la extracción Con A, con el fin de estabilizarla y mantenerla intacta a lo largo de todo el proceso. Mediante esta metodología es posible separar las vacuolas internas por medio de centrifugación a baja velocidad. Cuando usaron como marcador de superficie el isótopo ^{125}I y solubilizaron las membranas con detergentes, obtuvieron aproximadamente doce polipéptidos que van de 12 a 200 kDa de peso molecular y que corresponden a doce de las dieciocho proteínas recuperadas durante el proceso de purificación.

En relación a los estudios de protección en amibiasis, estos se han llevado a cabo en modelos animales, en los cuales se ha observado protección después de la inmunización con diversos antígenos de E. histolytica. El modelo de evaluación empleado es el de la inoculación intrahepática de trofozoitos de E. histolytica en hamsters adultos o neonatales, siendo éstos últimos los más empleados por la mayor reproducibilidad del absceso hepático amibiano en ellos. Desafortunadamente no ha sido posible desarrollar un modelo animal en el cual se pueda producir una infección amibiana natural por medio de la administración oral de quistes infectantes. Con el modelo disponible en hamsters (40 y 41) se han inmunizado con diversos antígenos de E. histolytica, como el extracto soluble total (42-45) y las fracciones obtenidas a partir de este a través de columnas de sefadex (67 y 42); también se han utilizado fracciones más puras, como las denominadas soluble I, soluble II, lisosómica y ribosómica, estas últimas con gran capacidad antigénica cuan-

do son enfrentadas con sueros de pacientes con amibiasis (10,46 y 47). La medición de títulos de anticuerpos antes de la inmunización y después de la infección no se correlacionan con la protección (7 y 49). El posible papel protector de la respuesta inmune celular que puede ser inducida bajo condiciones similares no ha sido estudiada.

Actualmente, el uso de técnicas de biología molecular - así como la disponibilidad de anticuerpos monoclonales ha - permitido un mayor conocimiento de la constitución molecu - lar de los parásitos en los diferentes estadios de su cre - cimiento y desarrollo. Así por ejemplo, los estudios actua - les con Plasmodium (31,32 y 33) tratan de identificar anti - genos en algunos de los estadios de su ciclo vital con el - fin de obtener aquellos de importancia biológica en mayor - cantidad, ya sea por medio de ingeniería genética (34 y 35) o bien por síntesis química (36 y 37). La obtención de an - tígenos por estos procedimientos tendría ventajas sustancia - les sobre los métodos tradicionales de aislamiento a partir de extractos de parásitos (38 y 39).

Las técnicas actuales de biología molecular han permiti - do la clonación de genes de parásitos, a través de la i - dentificación de RNA mensajero que codifica para proteínas con importancia biológica. Para esto se han empleado diver - sos métodos de extracción de RNA como el del fenol, tiocia - nato de guanidina, etc., (40 y 41). El RNA obtenido por es - tos métodos tiene actividad de mensajero, con la presencia de componentes de alto peso molecular en los productos de - traducción. Asimismo, las técnicas de traducción en siste - mas libres de células han permitido estudios de expresión - de antígenos en diversos estadios del ciclo de algunos pa - rásitos (52-54) y determinar con estos su posible importan - cia diagnóstica o de protección. Así, Hyde y col. (55) ais - laron la fracción poli(A)⁺ a partir del RNA de cultivos no sincronizados de Plasmodium (cepa K1). La traducción de es -

te RNA en un lisado de reticulocito requiere la adición de tRNA homólogo o heterólogo para su expresión, aunque esto no parece ser necesario para la traducción de mensajeros en otros parásitos. El patrón de los productos de traducción presenta aproximadamente 50 bandas con pesos moleculares de 16 a 230 kDa de peso molecular; de estas solo 32 son las más reproducibles. En la comparación de la expresión de proteínas en dos de los estadios de un cultivo sincronizado (trofozoítos y esquizontes), se observan diferencias por arriba de los componentes de 91 kDa, mientras que por debajo de este peso molecular los productos son comunes a ambos. Esto correlaciona con las proteínas presentes en cultivos de Plasmodium marcados con ³H-leucina a los mismos tiempos en que se hizo la extracción de RNA. Cuando se confrontan sueros de personas de un área endémica con los productos de traducción o bien con las proteínas marcadas provenientes de cultivos de parásitos se observa un reconocimiento heterogéneo de componentes en ambos casos; además el número de proteínas reconocido es similar a pesar de las diferencias debidas a modificaciones postraduccionales que pudieran existir entre las moléculas obtenidas a partir de un cultivo del parásito y de aquellas sintetizadas in vitro. Esto último es importante ya que el reconocimiento por los anticuerpos presentes en el suero de las personas no parece estar regido por regiones con modificaciones, tales como glucosilación. Los resultados con otras cepas de Plasmodium como por ejemplo P. chabaudi son similares a los obtenidos con P. falciparum, aunque esta no requiere para su traducción tRNA exógeno. Los patrones electroforéticos de cultivos no sincronizados muestran al menos 50 componentes que correlacionan con los patrones electroforéticos de cada uno de los estadios. Algunas de estas proteínas son comunes a todos los estadios, mientras que otras se sintetizan de manera predominante en algunos de ellos (53). Los sueros hi -

perinmunes detectan un número diferente de componentes en cada uno de los estadios probados. Sin embargo lo más relevante de este estudio es la identificación de un componente de alto peso molecular, detectado en los antígenos del parásito marcados biosintéticamente con ^{35}S -metionina y en los productos de traducción obtenidos con el RNA del parásito. Esto es importante, ya que este componente inmunogénico se encuentra localizado en la superficie del parásito, por lo que sería muy conveniente tratar de purificar este mRNA y clonar su cDNA.

Una observación interesante en los estudios con RNA es la realizada con P. yoelii en donde, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que confiere protección contra este parásito, se detectó que el mRNA que codifica para la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal se encuentra en la fracción poli-(A)⁻, esto es importante, ya que generalmente se aísla la fracción poli-(A)⁺ como paso inicial en la construcción de banco de genes, con lo que podrían quedar fuera proteínas con importancia en la protección contra este parásito. Con este mismo anticuerpo monoclonal se identifican tres polipéptidos sintetizados por un sistema de traducción libre de células, por lo que se sospecha de la presencia de más de una proteína que comparten el epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal en cuestión (52).

Se han hecho estudios similares en Schistosoma mansoni, parásito que posee dos etapas; larvaria y estado adulto (54, 56 y 57). Cuando se corren geles en condiciones desnaturizantes el RNA ribosomal corre como una sola especie, mientras que en condiciones no desnaturizantes se obtienen dos especies ribosomales (0.75 y 1.5×10^6 Da de peso molecular) En el patrón electroforético de los productos de traducción aparecen proteínas con pesos moleculares de 40 hasta 105 kDa, mientras que por electroforesis bidimensional y comparando los diferentes estadios se observan una mayor canti -

dad de productos de traducción, algunas de estas proteínas son comunes a todos los estadios; no obstante otras parecen ser específicos para cada estadio, en particular dos de ellas. Cuando se enfrentan sueros hiperinmunes de mono con los productos de traducción, es posible inmunoprecipitar al menos 13 componentes cuyos pesos moleculares van de 18 hasta 105 kDa. Con el suero de rata (hospedero no permisivo), se inmunoprecipitan de preferencia proteínas entre 30 y 45 kDa que están presentes en los productos de traducción de la cercaria y no en los de esquistosomas o en el parásito adulto, por lo tanto solo hay antígenos que son expresados en la fase cercaria, mientras que otros solo por las esquistosomas.

La traducción de preparaciones de RNA total y poli-(A)⁺ obtenidas de Cisticercus cellulosae en sistemas libres de células, ha permitido demostrar la presencia de productos de traducción conteniendo determinantes antigénicos semejantes a IgG del hospedero. Esto último sugiere que la presencia de proteínas que recubren la superficie del parásito y reaccionan con anticuerpos anti-IgG porcina, están contenidas en secuencias del RNA codificado por el genoma del parásito (58).

El objetivo de esta tesis es el aislar mRNA de E. histolytica, traducirlo en un sistema de traducción libre de células (lisado de reticulocito de conejo) y determinar en sus productos de traducción la presencia de antígenos específicos de esta especie, por medio de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra este protozoario.

MATERIALES Y METODOS

Cultivos de Amibas. Las cepas HK9:NIH, HM1:IMSS y Laredo tipo E. histolytica se cultivaron en medio axénico de Biosate-Peptona a 37°C como es descrito por Diamond (19,20 y 21). Los trofozoítos se cosecharon a diferentes tiempos de cultivo.

Antisueros. Se usaron anticuerpos policlonales humanos obtenidos de pacientes con amibiasis invasora y un anticuerpo monoclonal específico para E. histolytica (clona 004) (70).

Marcaje de los cultivos con ^3H -Leucina y ^{35}S -Metionina. Para evaluar la capacidad de biosíntesis de E. histolytica y de Laredo tipo-E. histolytica se hicieron alícuotas de 10 ml de cultivo a diferentes tiempos de incubación y se pulsaron con 0.5mCi de ^3H -leucina o de ^{35}S -metionina, por un periodo de 12 hr en condiciones estériles a 35°C. La síntesis se terminó colocando los cultivos en hielo-agua.

Fraccionamiento de los cultivos de células marcadas. Los cultivos de trofozoítos marcados con ^3H -leu o con ^{35}S -met se lavaron tres veces a 1500 rpm por 10 min a 4°C con solución amortiguadora de fosfatos salina pH 7.2. Al final del lavado se resuspendieron en 1 ml de PBS y se lisaron los trofozoítos por congelación y descongelación 5 veces en hielo seco-acetona en presencia de inhibidores de proteasas (fenil metil sulfonil fluoruro 5 mM, n-etil maleimida 5 mM y EDTA 5 mM final), después de lo cual se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4°C. El sedimento resultante que contiene la fracción de membranas totales se re-

suspendió en 1 ml de solución de PBS con inhibidores de proteasas a las concentraciones mencionadas. La fracción sobrenadante contiene las proteínas solubles

Extracción de RNA total. El RNA se aisló de trofozoitos recién cosechados por medio del método de clorhidrato de guanidina, con algunas modificaciones (48 y 60). Aproximadamente 50×10^6 trofozoitos se solubilizaron en 10 ml de solución de guanidina-HCl 8 M y acetato de potasio 10 mM, pH 5 y se homogenizaron (3 x 20 seg, 10,000 rpm) en un politrón (Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y.). El RNA del homogenado se precipitó con 0.5 volumen de etanol absoluto y se dejó reposar a -20°C durante 12 a 15 hr. El precipitado se disolvió en 10 ml de una solución que contenía guanidina-HCl 8 M, acetato de potasio 10 mM pH 5 y EDTA 20 mM pH 7. El proceso de precipitación de RNA se repitió tres veces más, y el precipitado obtenido se disolvió en 2 ml de EDTA 20 mM y se deslipidizó con una mezcla de cloroformo:butanol (4:1, v/v). Finalmente el RNA se precipitó con acetato de sodio 3 M a -20°C . El RNA obtenido se reprecipitó con acetato de potasio 0.2 M, pH 6, y dos volúmenes de etanol durante 12-16 hr a -20°C . Finalmente el precipitado obtenido se le disuelve y ajusta a una concentración de 1500 $\mu\text{g/ml}$ en agua tratada con dietil pirocarbonato.

Preparación del Sistema de Traducción in vitro. Se obtuvo la sangre heparinizada (500 a 1000 U de heparina/100 ml de sangre) de tres conejos Nueva Zelanda (2-2.5 kg) previamente anemizados con inyecciones repetidas de fenilhidrazina de acuerdo al método descrito por Darnbrough y col. (80), y se filtró a través de gasa esteril. Las células se colectaron por centrifugación a 2000 rpm durante 5

min a 2°C y el paquete celular se resuspendió en 5 volúmenes de una solución de NaCl 0.14 M, MgCl₂ 5 mM y KCl 50 mM y se volvió a centrifugar a la misma velocidad. Este procedimiento se repitió dos veces más eliminando los leucocitos y plaquetas por aspiración con vacío. Los reticulocitos se lisaron añadiendo un volumen de solución de lisis (MgCl₂ 2M, EDTA 0.1 mM y Ditiotreititol 1 mM) e incubando 10 min a 2°C y se hicieron alicuotas de 1-2 ml con el sobrenadante y se congelaron a -70°C hasta su uso (59).

El lisado se trató según el método de Pelham y Jackson (59). A un ml de lisado se le añadió una solución de hemina (0.8 mM), 25 µl y creatina cinasa (5 mg/ml), 10 µl. Se separó una alicuota de 25 µl como control de lisado no tratado y al volumen restante se le añadieron 20 µl de CaCl₂ (50 mM) y 30 µl de nucleasa de micrococo (1 mg/ml). Se incubó durante 10 min a 20°C y la reacción se terminó por adición de 20 µl de EGTA (100 mM). Se hicieron alicuotas de 50, 100 y 200 µl y se congelaron a -70°C hasta el momento de su uso.

Traducción del RNA del Parásito. Alicuotas del RNA total se adicionaron al lisado de reticulocitos de conejo tal como lo describe Pelham y Jackson (59). La mezcla de reacción total (15 µl) contenía: lisado (5 µl), cloruro de potasio (40 mM), acetato de potasio (100 mM), mezcla de aminoácidos sin metionina (1 mM), creatina fosfocinasa (30-mM), HEPES (75 mM, pH 7.2) y como precursor radioactivo - ³⁵S-metionina (10 uCi/ensayo; actividad específica 1050 uCi/mM, New England Nuclear). La mezcla se incubó por 60 min a 30°C y la traducción se terminó por adición de 2.5 µl de RNasa pancreática e incubación a 30°C durante 15 min.

Determinación de la Radioactividad Incorporada. La de terminación del isótopo se determinó midiendo la radioac -

tividad precipitable con TCA al 10% en las diferentes a -
licuotas. Las muestras se mantuvieron durante 30 min a 4°C
se filtraron en filtros de nitrocelulosa y se lavaron 3 ve
ces con TCA al 8%. Después de secar los filtros se midió -
su radioactividad para lo cual se les colocó en viales que
contenían 5 ml de líquido de centelleo y se procedió a co-
locarlos en un contador de centelleo líquido.

Fluorografía. Después de la electroforesis los geles
se prepararon para la fluorografía de acuerdo al método de
Laskey y Mills (61 y 62), tratándolos con una solución de
2,5-Difeniloxazol (PFO) 20% en Dimetil Sulfoxido (DMSO) y
se deshidrataron sobre papel Whatman número 3 (secador de
geles en placa Bio Rad). Los geles se expusieron a placas
Kodak XRP-5 durante 3 días a -70°C. Las placas se revela -
ron y fijaron de acuerdo con métodos convencionales de fo-
tografía.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. Los produc -
tos de traducción se solubilizaron en solución amortigua -
dora que contenía Tris-HCl 100 mM, pH 6.8; SDS 2% (p/v), -
glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0.1% (p/v) y urea
1 M. Las muestras se pusieron a ebullición en esta mezcla
durante 3 min y se corrieron en el sistema discontinuo de
Laemmli en geles al 6% que contenían urea (63).

Electrotransferencia e Inmunodetección. Los productos
de traducción se transfirieron según el método de Towbin -
(64), con algunas modificaciones. Brevemente, los produc -
tos de traducción se transfirieron a papel de nitrocelulo-
sa (Schleicher y Schuell, Inc Keene, N.H.) usando como bu-
ffer glicina 192 mM, Tris 25 mM y metanol 20% a 400 mA du-
rante 2 hr. Después de la transferencia y con el objeto de

saturar los sitios de unión a proteína remanentes, el papel de nitrocelulosa se incubó durante 2 hr a 35°C en una solución amortiguadora de fosfatos salina 0.01 M, pH 7.2, con albúmina bovina (grado RIA) 1.5% y gelatina 0.25%.

Después de bloquear las tiras de nitrocelulosa se incubaron durante 2 hr con una dilución apropiada de suero de pacientes con amibiasis hepática o con el anticuerpo monoclonal específico para E. histolytica. Las tiras se lavaron dos veces con PBS que contenía 0.3% Tween 20 y dos veces con PBS; cada una de ellas durante 10 min. A continuación, las tiras tratadas con los sueros de pacientes se hicieron reaccionar con un anticuerpo dirigido contra las cadenas pesadas de la IgG humana y las tratadas con el anticuerpo monoclonal con Proteína A. Tanto la anti-IgG humana como la proteína A se encontraban acopladas a peroxidasa. Después de esta incubación, las tiras se lavaron de la misma manera descrita anteriormente y se revelaron con diamino bencidina (50 mg/ml) y peróxido de hidrógeno (100 μ l/100 ml) al 3% en PBS pH 7.2 (64).

RESULTADOS

Extracción de RNA. Uno de los requisitos para el estudio de RNA es la preparación de RNA no degradado. Las preparaciones iniciales de RNA obtenidas a partir de trofozoitos congelados a -70°C inhibían la incorporación de ^{35}S -metionina en el lisado de reticulocito, por lo que la extracción de RNA se hizo inmediatamente después de cosechar los trofozoitos con lo cual se pudo obtener RNA con actividad de mensajero, cuya integridad se puede observar en la eficiencia de traducción de éste (Tabla 1). El RNA obtenido de HK9:NIH, HM1:IMSS y Laredo estimulan 4.54, 4.84 y 4.39 veces más la incorporación de ^{35}S -metionina respectivamente sobre el control (sin RNA). Sin embargo, la demostración más convincente de la actividad de las preparaciones de RNA es la calidad de las proteínas expresadas in vitro (Fig. 1) y analizadas en geles de SDS-urea al 6%, en los cuales podemos observar un patrón heterogéneo en los productos de traducción.

Cinética de Incorporación de RNA total. La Fig. 2 muestra la gráfica de dosis-respuesta para evaluar las preparaciones de RNA total de las cepas HM1:IMSS, HK9:NIH y Laredo en el lisado de reticulocito de conejo. Estas preparaciones de RNA fueron obtenidas de cultivos de trofozoitos en paralelo. En ella se observa una incorporación lineal hasta aproximadamente 6 μg de RNA para las cepas HK9:NIH y HM1:IMSS mientras que para la cepa Laredo el óptimo fue entre 3 y 4.5 μg de RNA total. También es evidente la promoción de síntesis de proteínas con las preparaciones de RNA, la cual fue mayor con las cepas HK9:NIH y Laredo.

Actividad de mRNA en E. histolytica y Laredo. Los RNAs

totales obtenidos a partir de los trofozoítos se tradujeron en el lisado de reticulocito de conejo con una eficiencia - comparable a los RNAs del reticulocito de conejo. La capacidad de traducción de los RNAs obtenidos de las cepas de E. histolytica HM1:IMSS, HK9:NIH y Laredo se puede ver en la Fig. 3, donde se observa un patrón heterogéneo de traducción de RNA total de poblaciones de trofozoítos no sincronizados. Estos RNAs se extrajeron en fase exponencial - tardía. El patrón de traducción de varias preparaciones de RNA total obtenidas de diferentes cultivos de trofozoítos - fue muy reproducible, por lo que solo se muestran los de una preparación de HM1:IMSS y HK9:NIH obtenida a las 60 hr - de cultivo, mientras que para Laredo fue a los 12 días de cultivo. La fluorografía representa la electroforesis en gel de poliacrilamida (egpa) al 6% en SDS-urea en condiciones reductoras. Como se puede observar el patrón de traducción para las tres cepas es heterogéneo con bandas radioactivas cuyos pesos moleculares van de 15,000 a 200,000 de peso molecular. En el caso de HK9:NIH y HM1:IMSS el patrón de traducción fue similar excepto por dos bandas de 75,000 y 150,000 de peso molecular no observadas en HM1:IMSS. En Laredo se observan diferencias cuantitativas y cualitativas sobre todo en los componentes de alto peso molecular.

Biosíntesis de Proteínas por E. histolytica (HM1:IMSS y HK9:NIH) y Laredo Durante la Curva de Crecimiento. La biosíntesis de proteínas durante la curva de crecimiento para las cepas utilizadas se siguió mediante la incorporación - del isótopo ^3H -leucina. Las cepas HM1:IMSS y HK9:NIH alcanzaron la fase estacionaria entre 60 y 72 hr de cultivo, en tanto que la cepa Laredo lo logró a los 12 días (Fig. 4). El patrón de incorporación para la síntesis de proteínas tales de la cepa HM1:IMSS es lineal hasta las 60 hr, des -

pués de lo cual no se observó mayor incremento en la radioactividad incorporada. Para la cepa HK9:NIH los resultados fueron similares sólo que la incorporación de radioactividad fue mayor. Por lo que respecta a la cepa Laredo, la incorporación de ^3H -leucina fue menor que para E. histolytica (Fig. 5).

Cuando se determinó la incorporación en las diferentes fracciones (soluble y sedimento 10 K) la fracción soluble 10 K de HK9:NIH incorporó más que la HMI:IMSS; sin embargo en el sedimento 10 K esto se invierte ya que se observa mayor incorporación en HMI:IMSS. Para Laredo las incorporaciones en las dos fracciones fue mucho menor que para las cepas histolyticas (ver Tabla II).

Síntesis de Proteínas Durante la Curva de Crecimiento. La capacidad de síntesis de proteínas a partir del RNA total obtenido a diferentes tiempos de cultivo se analizan en la Fig. 6. El patrón de síntesis de proteínas de las poblaciones de trofozoítos no sincronizados es complejo, mostrando una gran cantidad de proteínas. Este patrón no se modifica durante la curva de crecimiento. Estos cambios sólo son cuantitativos, ya que algunas de las bandas radioactivas se hacen más aparentes a lo largo del cultivo. Lo mismo sucede con la cepa Laredo, por lo que solo se muestra la fluorografía de los productos de traducción a los doce días de su curva de crecimiento.

Inmuno-detección de Productos de Traducción con Sueros de Pacientes con Amibiasis Hepática. Para estudiar las propiedades antigénicas de las proteínas sintetizadas en el lisado de reticulocito de conejo, se usaron sueros hiperinmunes de pacientes con amibiasis hepática. Para esto los productos de traducción se transfirieron a papel de nitro-

celulosa y se enfrentaron con los sueros de los pacientes. En la Fig. 7 se muestra el reconocimiento específico de los diferentes productos de traducción, con un patrón complejo para cada uno de los sueros empleados. No hay similitud en el patrón de reconocimiento entre los diferentes sueros de los pacientes, ni hay reconocimiento de alguna(s) proteína(s) en particular. Los sueros reconocen proteínas con pesos moleculares que van de 15,000 a 200, 000 Da. El carril ca corresponde a un suero de paciente con colitis amibiana, con un patrón de reconocimiento también complejo. El carril sn es el control de suero normal humano.

Reconocimiento de Proteínas por un Monoclonal anti-E. histolytica. El patrón electroforético de la cepa HM1:IMSS y Laredo es complejo tanto para la preparación de membranas (carril c y d) como para el soluble (carril a y b). En la comparación de cepas se observan proteínas en común entre las preparaciones de antígeno soluble y de membrana. En la preparación de la cepa HM1:IMSS el monoclonal reconoce sólo tres bandas con pesos moleculares mayores de 67, 000 Da, en tanto que el suero hiperinmune muestra un patrón heterogéneo de reconocimiento (carril e). El carril g es el control de inmunoglobulinas de ratón normal (Fig. 8)

Inmunodetección de Productos de Traducción con un Anticuerpo Monoclonal. Una vez que se caracterizó el anticuerpo monoclonal con los antígenos de membrana de la cepa HM1:IMSS, se procedió a enfrentar este anticuerpo con los productos de traducción del RNA total extraído de trofozoítos de la misma cepa. Aquí el anticuerpo monoclonal reconoce algunos de los productos de traducción de alto y bajo peso molecular; de estos, tres son los más prominentes. La especificidad de reconocimiento del monoclonal se puede ver en el carril c, ya que representa la fluorografía de -

una tira de nitrocelulosa que contiene los productos de tra
ducción (Fig. 9).

Tabla I

Traducción in vitro de RNA total de E. histolytica HM1:IMSS, HK9:NIH y Laredo (tipo E. histolytica)

Fuente	³⁵ S-metionina incorporada cpm x 10 ⁻³ /μg RNA	Estimulación relativa al control
HM1:IMSS	46.97	4.84
HK9:NIH	43.31	4.54
Laredo	56.77	4.39

Estos resultados representan los óptimos de traducción con RNA extraído después de 60 hr de cultivo para HM1:IMSS y HK9:NIH y de 12 días para la cepa Laredo.

Tabla II

Tiempo de Cultivo (Días)	Radioactividad (cpm x 10 ⁻⁴ /fracción) en Homogenados celulares					
	Fracción soluble 10K			Sedimento 10K		
	HMI:IMSS	HK9:NIH	Laredo	HMI:IMSS	HK9:NIH	Laredo
1.0	8.0	27.8	-	6.97	2.39	-
1.5	12.75	43.8	-	11.7	6.40	-
2.0	16.87	53.0	-	18.0	11.0	-
2.5	20.81	59.3	-	24.4	13.70	-
3.0	11.50	21.2	-	12.25	10.21	-
4.0	-	-	1.95	-	-	0.75
8.0	-	-	8.95	-	-	2.48
12.0	-	-	20.46	-	-	4.70
16.0	-	-	15.85	-	-	2.18

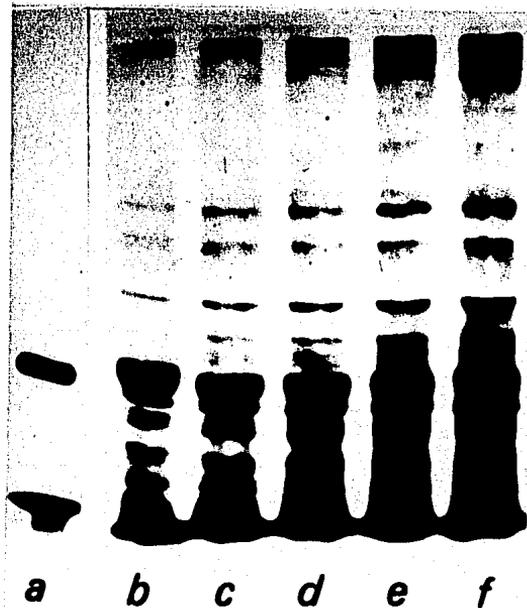


Fig. 1. Fluorografía de una EGPA-SDS de productos de traducción de E. histolytica HM1:IMSS. - Carril a, control sin RNA; b-f, HM1:IMSS con - concentraciones de 1.5 a 7.5 µg de RNA/ensayo.

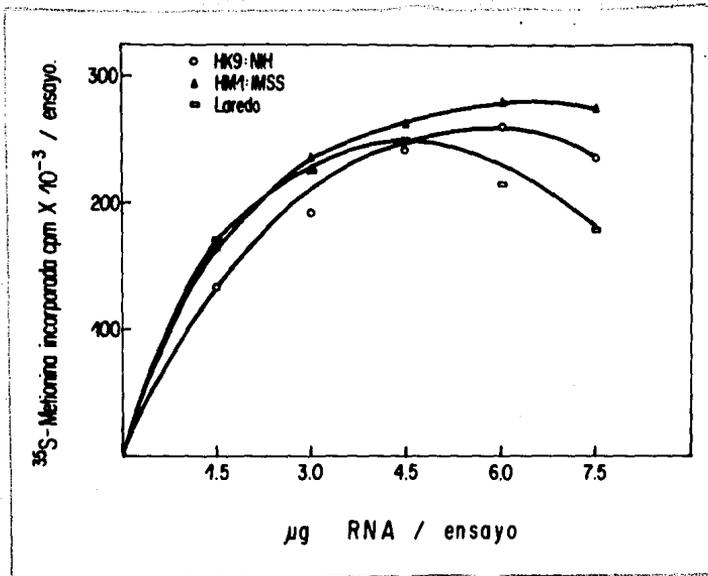


Fig. 2. Cinética de incorporación de ^{35}S -metionina con cantidades crecientes de RNA (1.5-7.5 μg /ensayo). E. histolytica HK9:NIH, o; HM1:IMSS \blacktriangle y Laredo tipo-E. histolytica \square .

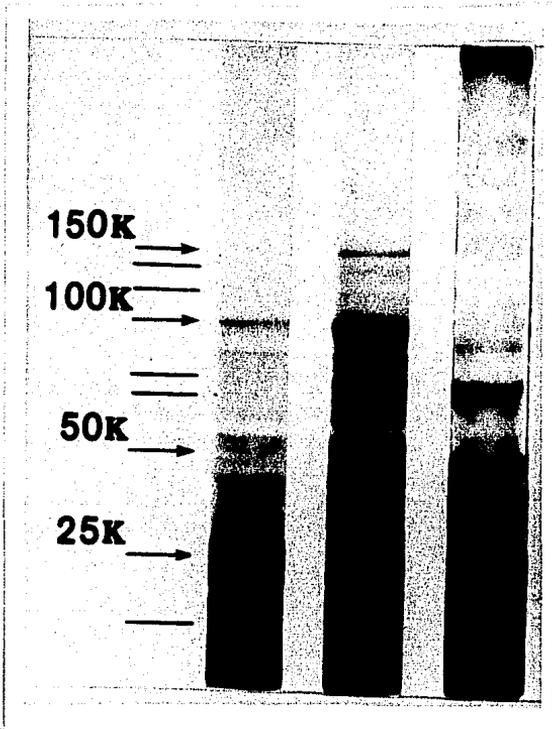


Fig. 3. Fluorografía de EGPA-SDS de productos de traducción de E. histolytica HM1:IMSS (carril 1); HK9:NIH (carril 2) y Laredo tipo-E. histolytica (carril 3).

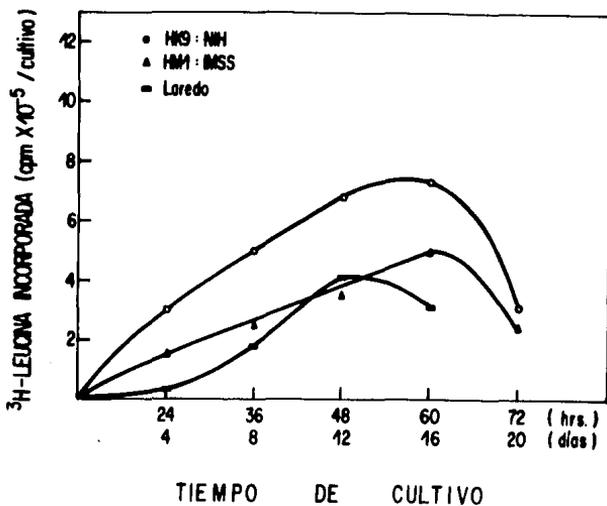


Fig. 4. Biosíntesis de proteínas en medio de cultivo de E. histolytica HM1:IMSS (▲); HK9:NIH (○) y Laredo tipo-E. histolytica (◻) usando como isótopo ³H-leucina.

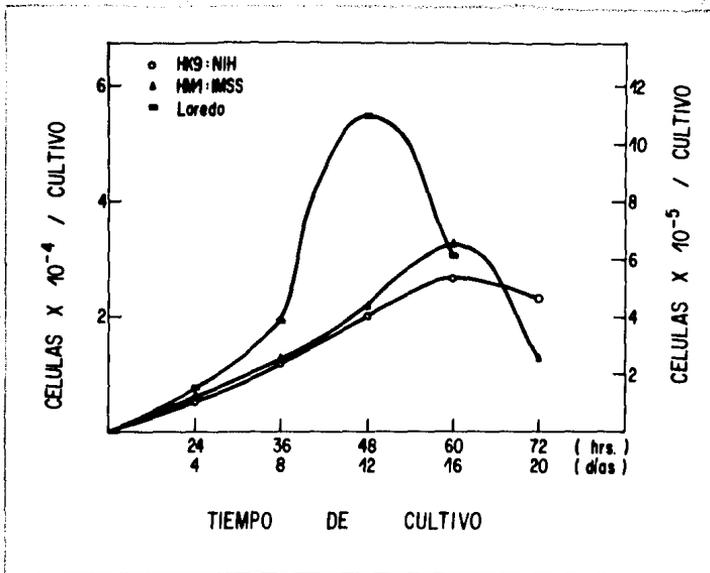


Fig. 5. Curvas de crecimiento de cepas E. histolytica HM1:IMSS (▲); HK9:NIH (○) y Laredo tipo-E. histolytica (■).

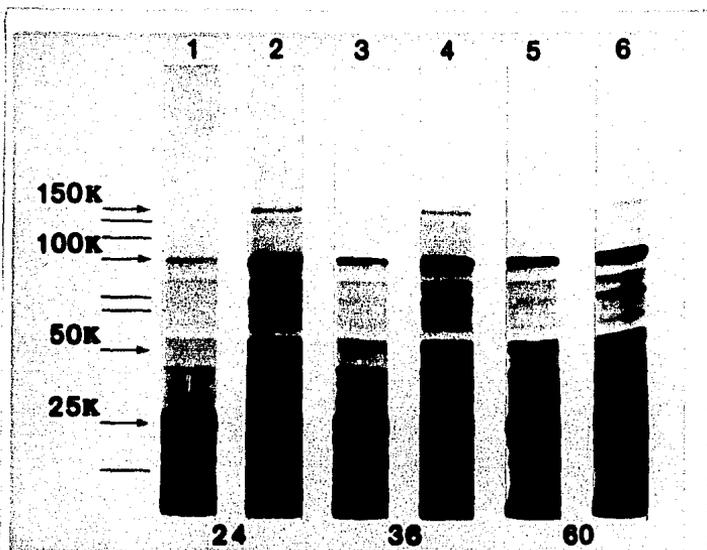


Fig. 6. Fluorografía de EGPA-SDS de productos de traducción de cepas *E. histolytica* HM1:IMSS (carriles 1,3 y 5) y HK9:NIH (carriles 2,4 y 6) sintetizados por el RNA obtenido a diferentes tiempos de su curva de crecimiento.

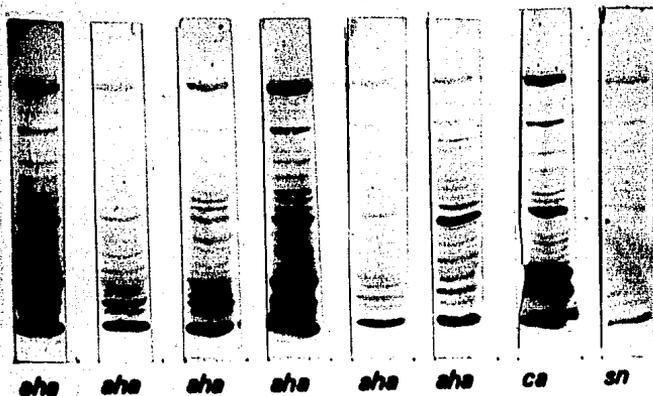


Fig. 7. Análisis por inmunolectrotransferencia de productos de traducción de la cepa HM1:IMSS enfrentados a sueros de pacientes con amibiasis hepática (aha), colitis amibiana (ca) y suero normal humano (sn).

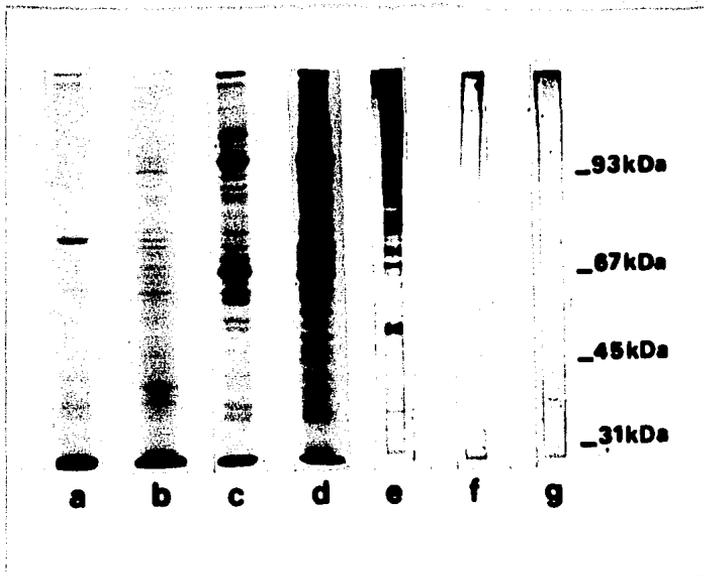


Fig. 8. Análisis por inmunoelectrotransferencia de extractos de trofozoitos de E. histolytica HM1:IMSS y Laredo tipo-E. histolytica. Carril a, extracto soluble (ES) HM1:IMSS; b, extracto soluble Laredo; c, membranas totales HM1:IMSS; d, membranas totales Laredo; e, suero policlonal de ratón enfrentado a membranas totales de HM1:IMSS; f, anticuerpo monoclonal enfrentado a membranas totales de HM1:IMSS y g, control con inmunoglobulina de ratón normal.

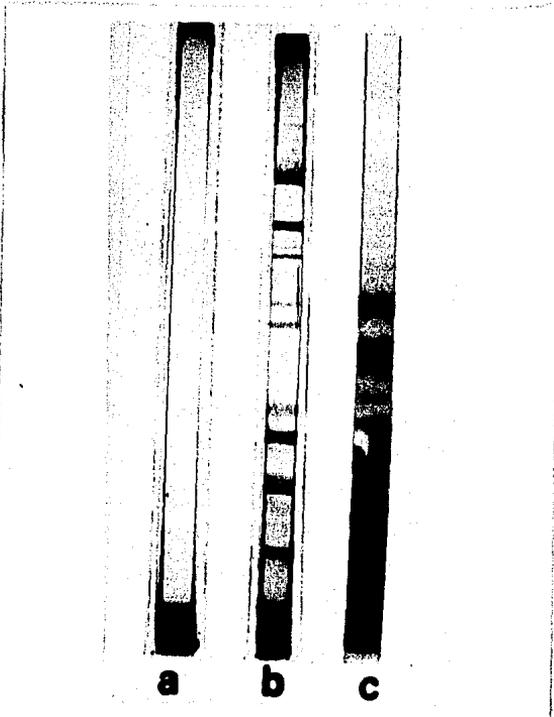


Fig. 9. Análisis por inmunoelectrotransferencia de productos de traducción de cepa HM1:IMSS enfrentados a suero normal humano (carril a), anticuerpo monoclonal (carril b). Carril c representa la fluorografía de productos de traducción presentes en la tira de nitrocelulosa

DISCUSION

Como un primer paso en la identificación de genes que codifiquen para antígenos de E. histolytica se han estudiado los antígenos sintetizados por un sistema de traducción libre de células (lisado de reticulocito de conejo) utilizando RNA total, extraído de cultivos no sincronizados de trofozoítos de las cepas HM1:IMSS, HK9:NIH así como de la cepa Laredo tipo E. histolytica. Mediante el empleo de la técnica de clorhidrato de guanidina (48 y 60) fué posible la purificación de RNA a partir de trofozoítos, ya que se ha reportado la dificultad para aislar RNA a partir del género Entamoeba debido a la presencia de una potente RNasa, la cual resiste algunos métodos de extracción tales como el de fenol (41). Sin embargo el método aquí empleado permitió la preparación de RNA intacto con buen rendimiento. El análisis de los productos de traducción muestra que la degradación que pudiera existir en las preparaciones es mínima (Fig. 1). El RNA de E. histolytica se traduce tan eficientemente en el lisado de reticulocito de conejo como los RNA del reticulocito mismo y similar a los reportados para el RNA de otros parásitos (40,44 y 65). Además la traducción de estos RNA no parece requerir la adición de algún factor adicional al lisado para su eficiente traducción, como en el caso del RNA de Plasmodium lophurae y P. falciparum que requieren de tRNA exógenos de los mismos parásitos para su eficiente traducción en el lisado de reticulocitos (66).

El análisis de los antígenos sintetizados por E. histolytica en varios puntos de su curva de crecimiento sólo muestra que éstos son sintetizados en mayor proporción conforme aumenta el tiempo de cultivo. Estas diferencias probablemente sean debidas al crecimiento no sincronizado de

los trofozoítos, ya que todos los polipéptidos son sintetizados durante toda la curva de crecimiento. Un aspecto interesante sería trabajar con líneas clonadas de E. histolytica y con cultivos sincronizados, ya que la heterogeneidad genética que se encuentra en aislamientos no clonados no se hace evidente en los productos proteínicos sintetizados in vitro (67).

El enfrentamiento de los productos de traducción de los trofozoítos de HM1:IMSS con suero de pacientes con amibiasis hepática, demuestra que algunos de los RNA corresponden a genes cuyos productos inducen una respuesta inmune específica en tales individuos. Esto resulta interesante, ya que a partir de estos mRNA se puede obtener cDNA y de esta manera genes que pudieran tener importancia en el diagnóstico o en la profilaxis de la enfermedad, como ha sido el caso en algunas parasitosis (34,35 y 36). Además esto demuestra que el suero de los pacientes contiene anticuerpos que reconocen las características de esas cadenas polipeptídicas, más que las modificaciones postraduccionales que pudieran llevarse a cabo, tales como glucosilación. Los resultados sugieren que estos productos pueden ser obtenidos a partir de genes clonados y expresados en sistemas tales como Escherichia coli. De ser así, estos productos podrían usarse para inducir una respuesta protectora en humanos.

Actualmente uno de los avances más significativos es sin duda la obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de parásitos (68,69,70 y 71). Si bien estos anticuerpos monoclonales no se comportan como los anticuerpos policlonales, ya que en algunos casos no precipitan, no fijan complemento ni opsonizan, tienen la ventaja de ser homogéneos, específicos, fácilmente estandarizables y además de que su disponibilidad no tiene límite.

Se han encontrado numerosas aplicaciones para estos anticuerpos en diferentes áreas tales como: identificación de antígenos, mapeo de epítopes, purificación de antígenos, definición de variantes, análisis de antígenos de diferenciación, diagnóstico patológico y elucidación de patogénesis, genética de transplantes y diagnóstico de enfermedades infecciosas (69 y 70).

Con el anticuerpo monoclonal utilizado se reconocieron varios polipéptidos, tanto en los antígenos del parásito como en sus productos de traducción. Este anticuerpo reconoce epítopes que se encuentran en la superficie del parásito (70), por lo que los experimentos con los productos de traducción sugieren la presencia de mRNA que codifica para proteínas de superficie de los trofozoítos. El reconocimiento de varios polipéptidos por este monoclonal es un hecho interesante. Existen varias posibilidades para explicarlo. Una de ellas es el procesamiento de proteínas, como se ha reportado en P. falciparum (72 y 73), en el cual mediante el uso de un anticuerpo monoclonal detectan en un extracto obtenido a partir de una población no sincronizada de esquizontes un polipéptido de alto peso molecular junto con otros de menor peso, existiendo entre ellos una relación precursor-producto. Hallazgos similares han sido descritos con P. yoelli (74) y P. knowlesi (75). En E. histolytica esto es difícil de probar, ya que sería necesario trabajar con cultivos sincronizados, no disponibles, y observar la aparición de los productos procesados. Otra posibilidad para explicar el reconocimiento de varias proteínas por el monoclonal anti-E. histolytica, es que ocurra una degradación de los componentes proteicos durante el proceso de extracción (75 y 76). Esto se ha observado en otros estudios; así cuando se incubaba el precursor (230 kDa) marcado de P. knowlesi con actividades enzimáticas de merozoítos de P. falciparum

se obtienen los mismos productos (200, 145 y 110 kDa) que a partir de extractos de esquizontes o merozoítos maduros de P. knowlesi (75). Sin embargo a diferencia de lo que sucede in vivo en los sistemas de traducción libres de células, ta les proteasas no aparecen y solo se observa la banda precursora (53). Es por tanto de importancia el uso de inhibidores a concentraciones adecuadas. En nuestro caso se usaron sustancias que inhiben una proteinasa neutra, la cual es una de las principales en trofozoítos de HM1:IMSS (77). Otra posible explicación es que se trate de proteínas sintetizadas individualmente y que compartan epítopes. Esto podría ser sugerido por los resultados obtenidos con los productos de traducción y el anticuerpo monoclonal, ya que las proteínas reconocidas por éste parecen estar codificadas por mRNA con diferentes coeficientes de sedimentación. Además bajo condiciones de traducción en sistemas libres de células no hay procesamiento de proteínas por lo que se puede sugerir la existencia de más de un polipéptido que comparte el epítipo reconocido por el monoclonal usado.

Recientemente se ha observado en P. falciparum la presencia de familias de proteínas estructural y antigénica - mente polimórficas (78 y 79), las cuales también podrían ser responsables de la posible diversidad antigénica de E. histolytica sugerida por los resultados obtenidos con el anticuerpo monoclonal. Esto podría ser probado usando en lugar de una mezcla de organismos que difieren genéticamente, líneas clonadas genéticamente distintas. Un requisito importante es que las clonas utilizadas sean estables y fenotípicamente homogéneas como se ha demostrado para P. falciparum (78). Otras observaciones que sugieren la heterogeneidad de E. histolytica es que cepas virulentas de HM1:IMSS están compuestas de una mezcla de células con diferentes - capacidades fagocíticas (5).

El desarrollo de estas áreas serán fundamentales y au
nadas al uso de anticuerpos monoclonales ayudarán a la de-
dinición de antígenos relevantes en la biología de E. his-
tolytica.

BIBLIOGRAFIA

1. Ortiz-Ortiz, L. and Avella, M.L. (1984). Respuesta inmune en infecciones por Entamoeba histolytica. *Inmunologia (Spain)* 3, 5-11.
2. Gutierrez, G., Ludlow, A., Espinosa, G., Herrera, S., - Muñoz, O., Rattoni, N. and Sepúlveda, B. (1976). Encuesta serológica nacional. II. Investigación de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en la República Mexicana. - In B. Sepúlveda and L.S. Diamond (Eds.) *Proceedings of the International Conference on Amebiasis*, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., pp. 599-608.
3. Krupp, I. (1970). Antibody response in intestinal and - extraintestinal amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, - 57-62.
4. Chacín-Bonilla, L. and Bonpart, D. (1981). A seroepide - miological study of amebiasis in adults in Maracaibo Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 1201-1205.
5. Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A. and Sán - chez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*; Phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.* 158, 1511-1521.
6. Alam, M. and Ahmad, S. (1974). Immunogenicity of Enta - moeba histolytica antigen fractions. *Trans. Roy. Soc. - Trop. Med. Hyg.* 68, 370-373.
7. Krupp, I.M. (1974). Protective immunity to amebic infec - tion demonstrated in guinea pigs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23, 355-360.
8. Jackson, T.F.H.G., Anderson, C.B. and Simjee, A.E. - (1984). Serological differentiation between past and - present infection in hepatic amoebiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 342-345.
9. Muñoz, M.L., Calderón, J. and Rojkind, M. (1982). The - collagenase of Entamoeba histolytica. *J. Exp. Med.* 155, 42-51.

10. Sepúlveda, B., Arroyo, B.A., Tanimoto, W.M., Martínez-Palomo, A. and Ortiz-Ortiz, L. (1978). Simposio: In - ducción de inmunidad protectora antiamebiana con "nuevos" antígenos en el hamster lactante. a. Introducción Arch. Invest. Med. (Méx.) 9 (Suppl 1), 309-310.
11. Chang, S.M., Lin, C.M., Dusanic, 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(5), 845-853.
12. Goldman, M. and Cannon, L.T. (1967). Antigenic analysis of Entamoeba histolytica by means of fluorescent - antibody V. Comparison of 15 strains of Entamoeba with information on their pathogenicity to guinea pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 16, 245-254.
13. Cole, B.A. and Kent, J.F. (1953). Immobilization of - Entamoeba histolytica in vitro by antiserum produced - in the rabbit. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 811-814.
14. Ishaq, M. and Padma, M.C. (1980). Antigenic variations among strains of E. histolytica. Ann. Trop. Med. Parasitol. 74, 373-375.
15. Sehgal, S.C., Gupta, S., Chhiber, S. and Vadehra, D.V. (1982). Gel filtration pattern of axenic Entamoeba histolytica and characterisation of immunological specificities of various fractions. Indian J. Med. Res. 75, 28-32.
16. Ali-Khan, Z. and Meerovitch, E. (1970). Studies on the purification of Entamoeba histolytica antigens by gel filtration. I. Some physicochemical properties of the isolated fractions. Can. J. Microbiol. 16, 485-492.
17. Ali-Khan, Z. and Meerovitch, E. (1970). Studies on the purification of Entamoeba histolytica antigens by gel filtration II. The antigenic properties of the isolated fractions. Can. J. Microbiol. 16, 493-498.

18. Marquez, N.S., Tamayo, F.G. and Kumate, J. (1978). Inmunoquímica de proteínas inmunogénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9 (Suppl. 1), 149-154.
19. Diamond, L.S. (1961). Axenic cultivation of Entamoeba histolytica. Science. 134, 336-337.
20. Diamond, L.S. (1968). Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903, and E. histolytica-like amebae. J. Parasitol. 54, 1047-1056.
21. Diamond, L.S., Harlow, D.R. and Cunnick, C.C. (1978).- A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 431-432.
22. Sanchez, M.N., García, T.F. and Kumate, J. (1978). Inmunoquímica de proteínas inmunogénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9 (Suppl. 1), - 149-154.
23. Krupp, I.M. (1977). Definition of the antigenic pattern of Entamoeba histolytica, and immunoelectrophoretic analysis of the variations of patient response to amebic disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26, 387-392.
24. Ravdin, J.I. and Guerrant, R.L. (1981). Role of adherence in cythopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica: study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J. Clin. Invest. 68, 1305-1313
25. Trissl, D., Martínez-Palomo, A., Argüello, C., de la Torre, M. and de la Hoz, R. (1977). Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several strains. J. Exp. Med. 145, - 652-665.
26. Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Chávez, B., Orozco, E., Fernández-Castelo, J. and Cervantes, A. - (1985) Structural basis of the cytolytic mechanism of Entamoeba histolytica. J. Protozool. 32, 166-175.

27. Acosta, V.H., Muñoz, M.M.L. and Calderón, J. (1978). - Caracterización de moléculas superficiales de Entamoeba invadens. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9 (Suppl 1), - 175-181.
28. Jimenez, C.E., Soto, J.O., Kumate, J. y Ortiz, B. - (1982). Purificación parcial de algunos antígenos de - superficie de E. histolytica. Investigación de la ac - tividad biológica frente a sueros de pacientes con ab - sceso hepático amibiano. Arch. Invest. Med. (Méx.) 13 (Suppl 3), 281-289.
29. Calderón, J., Parkhouse, M. and Cid, M.E. (1978). I - dentificación de antígenos de membrana de E. histolytica con anticuerpos de pacientes con amibiasis. Arch. - Invest. Med. (Méx.) 9 (Suppl 1), 211-218.
30. Aley, S.B., Scott, W.A. and Cohn, Z.A. (1980). Plasma membrane of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152, - 391-404.
31. Dame, B.Z., Williams, J.L., McCutchan, T.F., Weber, J. L., Wirtz, R.A., Hochmeyer, W.T., Maluy, W.L., Haynes, J.D., Schneider, I., Roberts, D., Sanders, G.J., Reddy E.P., Diggs, C.L. and Miller, L.H. (1984). Structure - of the gene encoding the immunodominant surface anti - gen on the sporozoite of the human malaria parasite - Plasmodium falciparum. Science. 225, 593-599.
32. Stahl, H.D., Crewther, P.E., Anders, R.F., Brown, G.V. Coppel, R.L., Bianco, A.E., Mitchell, G.F. and Kemp, - D.J. (1985). Interspersed blocks of repetitive and - charged aminoacids in a dominant immunogen of Plasmo - dium falciparum. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82, 543- 547.
33. Enea, V., Ellis, J., Zavala, F., Arnot, D.E., Asava - nich, A., Masuda, A.A., Quakyi, I. and Nussenzweig, R. S. (1984). DNA cloning of Plasmodium falciparum cir - cumsporozoite gene: Aminoacid sequence of repetitive -

- epitope. *Science*. 225, 628-630.
34. Young, J.F., Hockmeyer, W.T., Gross, M., Ripley, B.W. Wirtz, R.A., Trostler, J.H., Beaudoin, R.L., Hollingdale, M.R., Miller, L.H., Diggs, C.L. and Rosenberg, M. (1985). Expression of Plasmodium falciparum circumsporozoite proteins in Escherichia coli for potential use in a human malaria vaccine. *Science*. 228, 958-962.
 35. Arnot, D.E., Barnwell, J.W., Tam, J.P., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S. and Enea, V. (1985). Circumsporozoite protein of Plasmodium vivax: Gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science*. 230, 815-818.
 36. Vergara, U., Ruiz, A., Ferreira, A., Nussenzweig, R. S. and Nussenzweig, V. (1985). Conserved group-specific epitopes of the circumsporozoite proteins revealed by antibodies to synthetic peptides. *J. Immunol.* 134, 3445-3448.
 37. DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T. and Mowat, N. (1986) Protection of cattle against foot and mouth disease by a synthetic peptide. *Science*. 232, 639-641.
 38. Liew, F.Y. (1985). New aspects of vaccine development. *Clin. Exp. Immunol.* 62, 225-241.
 39. Mitchell, G.F. (1984). Towards molecular vaccines against parasites. *Parasite Immunol.* 6, 493-498.
 40. Reinertson, J.W. and Thomson, P.E. (1951). Experimental amebic hepatitis in hamsters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76, 518-521.
 41. Jarumilinta, R.A. (1966). A simple method of inducing amoebic liver abscess in hamsters. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 60, 139-145.
 42. Ghadirian, E., Meerovitch, E., Hartmann, D.P. (1980) - Protection against amebic liver abscess in hamsters by means of immunization with amebic antigen and some

- of its fractions. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29(5), 779-784.
43. Tanimoto-Weki, M., Vazquez, S.J.A., Calderón, L.P. and Aguirre, G.J. (1973). Inmunidad consecutiva a la inyección de antígeno amibiano axénico en el hamster. Arch. Invest. Med. (Méx.) 4 (Suppl 1), 147-154.
 44. Sepúlveda, B., Tanimoto-Weki, M., Vázquez, S.J.A. and Janda, L. (1971). Inducción de inmunidad antiamebiana en el hamster con antígeno obtenido de cultivos axénicos de Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx) 2 (Suppl 1), 289-294.
 45. Sepúlveda, B., Tanimoto-Weki, M., Calderón, P. and de la Hoz, R. (1974). Inmunidad en hamsters consecutiva a vacunación con cultivos monoxénicos y axénicos de E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 4 (Suppl 1), 159-164.
 46. Arroyo, B.A. (1978). Simposio. Inducción de inmunidad protectora antiamebiana con "nuevos" antígenos en el hamster lactante. b. Material antigénico. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9 (Suppl 1), 311-314.
 47. Sepúlveda, B. (1978). Simposio: Inducción de inmunidad protectora antiamebiana con "nuevos" antígenos en el hamster lactante f. Comentarios y conclusiones. Arch. Invest. Med. (Méx.) 9 (Suppl 1), 327-328.
 48. Krupp, I.M. and Powell, S.J. (1971). Comparative study of the antibody response in amebiasis. Persistence after successful treatment. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20, 421-424.
 49. Stamm, W.P., Ashley, M.J. and Bell, K. (1976). The value of amoebic serology in an area of low endemicity. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 70, 49-53.
 50. Wallach, M. (1982). Efficient extraction and translation of Plasmodium falciparum messenger RNA. Mol. Biochem. Parasitol. 6, 335-342.

51. Heebner, G.M. and Albach, R.A. (1982). High salt SDS-DEP technique for isolation of intact RNA from E. histolytica. Arch. Invest. Med. (Méx.) 13 (Suppl 3), 23 - 28.
52. Vaidya, A.B., Schleif, W.A., Majarian, W.R., Daly, T. M., Taylor, D.W. and Long, C.A. (1984). Analysis of mRNA coding for blood-stage antigens of a rodent malarial parasite Plasmodium yoelii: mRNA coding for a possible protective antigen purify as a poly A⁻. J. Immunol. 132, 3126-3130.
53. Da Silveira, J.F. and Mercereau-Puijalon, O. (1983). Plasmodium chabaudi antigens synthesized in an mRNA dependent cell-free translation system. Mol. Biochem. Parasitol. 7, 159-172.
54. Grausz, D., Dissous, C., Capron, A. and Roskam, W. (1983). Messenger RNA extracted from Schistosoma mansoni larval forms codes for parasite antigens when translated in vitro. Mol. Biochem. Parasitol. 7, 293 - 301.
55. Hyde, J.E., Goman, M., Hall, R., Osland, A., Hope, I. A., Langsley, G., Zolg, J.W. and Scaife, J.G. (1984). Characterization and translation studies of messenger RNA from the human malaria parasite Plasmodium falciparum and construction of a cDNA library. Mol. Biochem. Parasitol. 10, 269-285.
56. Tenniswood, M.P.R. and Simpson, A.J.G. (1982). The extraction, characterization and in vitro translation of RNA from adult Schistosoma mansoni. Parasitology. 84, 253-261.
57. Taylor, D.W., Cordingley, J.S. and Butterworth, A.E. (1983) Immunoprecipitation of surface antigen precursor from Schistosoma mansoni messenger RNA: In vitro translation products. Mol. Biochem. Parasitol. 10, -

305-318.

58. Díaz de León, L., Arcos, L. and Willms, K. (1982). The use of cell-free systems for the characterization of - Cysticercus cellulosa antigens. In A. Flisser, J.P. - Laclete, K. Willms and C. Larralde (Eds.). *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*, Academic Press, USA. pp. 465-475.
59. Pelham, H.R.B. and Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte - lysates. *Eur. J. Biochem.* 67, 247-256.
60. Strohman, R.C., Moss, P.S., Micou-Eastwood, J., Spector, D., Przybyla, A. and Paterson, B. (1977). Messenger RNA for myosin polypeptides: isolation from simple myogenic cell culture. *Cell.* 10, 265-270.
61. Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88.
62. Laskey, R.A. and Mills, A.D. (1975). Quantitative detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* 56, 335-341.
63. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. - *Nature.* 227, 680-685.
64. Towbin, H.D., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some - applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76, 4350-4354.
65. Gross, De Sá, M.F., De Sa, C., De Almeida, E.R.P., Da Cruz, W.B., Fihla, S.A. and Gander, E.S. (1984). Optimization of a protein synthesizing lysate system - from Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 10, 347-354.
66. Wallach, M. and Killejia, A. (1982). The importance -

- of tRNA for the in vitro cell-free translation of messenger RNA isolated from the malaria parasite Plasmodium lophurae. Mol. Biochem. Parasitol. 5, 245-261.
67. Rosario, V.(1981). Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. Science. 212, 1037-1038.
 68. Smith, M.A. and Clegg, J.A.(1985). Vaccination against Schistosoma mansoni with purified surface antigens. - Science. 227, 535-538.
 69. Campbell, G.H., Miller, L.H., Hudson, D., Franco, E.L. and Andrysiak, P.M. (1984). Monoclonal antibody: characterization of Plasmodium falciparum antigens. Am. J. Trop.Med. Hyg. 33(6), 1051-1054.
 70. Ortiz-Ortiz, L., Ximenez, C., Mendoza, F., Michalak, C Melendro, E.I. and Oliva, A. (1986). Entamoeba histolytica: Specific antigen recognized by a monoclonal antibody. Exp. Parasitol. 61, 390-397.
 71. Montaraz, J.A., Novotny, P. and Ivanyi, J. (1985). Identification of 68 kilodalton protective protein antigen from Bordetella bronchiseptica. Infect. Immun. - 47, 744-751.
 72. Holder, A.A. and Freeman, R.R. (1982). Biosynthesis and processing of a Plasmodium falciparum schizont antigen recognized by immune serum and monoclonal antibody. J. Exp. Med. 156, 1528-1538.
 73. Holder, A.A. and Freeman, R.R. (1984). The three major antigens on the surface of Plasmodium falciparum merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. J. Exp. Med. 163, 536-549.
 74. Holder, A.A. and Freeman, R.R. (1981). Immunization against blood stage rodent malaria using purified parasite antigens. Nature. 294, 361-363.
 75. David, P.H., Hadley, T.J., Aikawa, M. and Miller, L.H.

- (1984). Processing of a major parasite surface glycoprotein during the ultimate stages of differentiation in Plasmodium knowlesi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11, 267-282.
76. Campbell, G.H., Miller, L.H., Hudson, D., Franco, E. L. and Andrysiak, P.M. (1984). Monoclonal antibody - characterization of Plasmodium falciparum antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33(6), 1051-1054.
77. Keene, W.E., Petitt, M.G., Allen, S. and McKerrow, J. H. (1986). The major neutral proteinase of Entamoeba histolytica. *J. Exp. Med.* 163, 536-549.
78. Mc Brido, J.S., Newbold, C.I. and Anand, R. (1985). - Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *J. Exp. Med.* 161, 160-180.
79. Brown, K.N., Jarra, W., Newbold, C.I. and Schryer. - (1985). Variability in parasite antigen structure and protective immunity to malaria. *Ann. Inst. Pasteur/ - Immunol.* 136C, 11-23.
80. Darnbrough, C., Legon, S., Hunt, T. and Jackson, R.J. (1973). Initiation of Protein Synthesis: Evidence for Messenger RNA-independent Binding of Methionyl-transfer RNA to the 40 S Ribosomal Subunit. *J. Mol. Biol.* 76, 379-403.