

19  
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán

NATURALEZA QUIMICA DE EPITOPES  
DE E histolytica RECONOCIDOS  
POR ANTICUERPOS MONOCLONALES

**TESIS**

Que para Obtener el Título de :

Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA

Sirenia González Posos

DIRECTOR DE TESIS: Dra. EVA EDILIA AVILA MURO

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 1989



**FALLA DE ORIGEN**



## **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

	Pág.
LISTA DE FIGURAS .....	i
ABREVIATURAS .....	iii
RESUMEN .....	iv
I. INTRODUCCION .....	1
1. <u>Entamoeba histolytica</u> .....	1
1a. Ciclo de vida .....	2
1b. Citopatogenicidad .....	3
2. Anticuerpos monoclonales .....	7
2a. Antecedentes .....	7
2b. Producción de anticuerpos monoclonales .....	9
2c. Aplicación de los anticuerpos monoclonales .....	9
2d. Anticuerpos monoclonales en la caracterización de moléculas químicas .....	10
II. OBJETIVOS .....	12
III. MATERIALES .....	13
IV. METODOS .....	14
1. Cultivo de <u>E. histolytica</u> .....	14
2. Obtención de anticuerpos policlonales .....	14
3. Anticuerpos monoclonales anti- <u>E. histolytica</u> .....	15
4. Ensayo inmunoenzimático en fase sólida ELISA .....	16
4a. Preparación de antígeno .....	16
4b. Detección de especificidades .....	16
5. Control de oxidación de los carbohidratos de <u>E. histolytica</u> mediante ELISA .....	17
6. Reconocimiento de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> por anticuerpos monoclonales .....	19

7. Obtención de antígenos para electroforesis .....	20
8. Electroforesis de antígenos de <u>E. histolytica</u> en geles de poliacrilamida-SDS ....	20
9. Electrotransferencia de antígenos de <u>E. histolytica</u> a papel de nitrocelulosa .....	21
10. Tinción de proteínas en PNC .....	22
11. Oxidación de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> en PNC .....	22
12. Reconocimiento de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> por anticuerpos monoclonales en PNC .....	23
13. Reconocimiento de proteínas de <u>E. histolytica</u> por anticuerpos monoclonales mediante inmunodot .....	25
V. RESULTADOS .....	28
1. Oxidación de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> ....	28
2. Efecto de $\text{NaIO}_4$ sobre una proteína (BSA).....	30
3. Reconocimiento de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> por anticuerpos monoclonales mediante ELISA .....	30
4. Patrón antigénico de extracto total de <u>E. histolytica</u> .....	35
5. Oxidación de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> en PNC .....	35
6. Efecto de metaperiodato de sodio sobre la actina de <u>E. histolytica</u> .....	38
7. Reconocimiento de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> por anticuerpos monoclonales en PNC .....	38
8. Reconocimiento de proteínas de <u>E. histolytica</u> por anticuerpos monoclonales mediante inmunodot..	40
VI. DISCUSION .....	45
VII. CONCLUSIONES .....	51
VIII. REFERENCIAS .....	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Teoría de la selección clonal.....	8
Figura 2 Detección de glucoconjugados y anticuerpos contra amiba por el método de ELISA.....	18
Figura 3 Diagrama de la detección de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> en PNC.....	24
Figura 4 Oxidación de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> en ELISA.....	29
Figura 5 Efecto de $\text{NaIO}_4$ sobre una proteína que no contiene carbohidratos. ....	31
Figura 6 Reconocimiento de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> por los monoclonales: A57, A14A12, F9, A8 y C6...	32
Figura 7 Reconocimiento de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> por los monoclonales: A35, 6G9, 1D10, D12 y 2FII..	33
Figura 8 Reconocimiento de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> por los monoclonales: D4, 3B6, 1H8, 6H3 y D10.....	34
Figura 9 Patrón antigénico de extracto total de <u>E. histolytica</u> .....	36
Figura 10 Oxidación de carbohidratos de <u>E. histolytica</u> en PNC.....	37
Figura 11 Efecto de $\text{NaIO}_4$ sobre la actina de <u>E. histolytica</u> .....	39

<b>Figura 12</b> Reconocimiento de carbohidratos de <u>E.histolytica</u> por anticuerpos monoclonales en PNC.....	41
<b>Figura 13</b> Reconocimiento de proteínas de <u>E.histolytica</u> por anticuerpos monoclonales mediante inmunodot.....	42
<b>Figura 14</b> Reactividad de anticuerpos monoclonales anti- <u>E. histolytica</u> después de tratar los antígenos con calor.....	44

ABREVIATURAS

- Ac.- Anticuerpo  
Acs.- Anticuerpos.  
alfa-MM.- alfa-metil-D-manósido.  
BSA.- Albúmina sérica de Bovino.  
buffer A.-  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  0.25 mM, NaCl 154 mM y Tween 20 0.05%  
Con A.- Concanavalina A.  
DMEM.- Medio Eagle Modificado por Dulbecco.  
FBS.- Suero Fetal de Bovino.  
HAT.- Hipoxantina- Aminopterina- Timidina.  
Ig.- Inmunoglobulina.  
Igs.- Inmunoglobulinas.  
Iodogen.- 1,3,4,6-tetracloro-3a-6a-difenilglicouronilo.  
PBS.- Amortiguador de fosfato de potasio 15 mM pH 7 y Cloruro de sodio 154 mM.  
PBS-A.- Amortiguador de fosfato de potasio 15 mM pH 7 y Cloruro de sodio 175 mM.  
PEG-400.- Polietilenglicol- 400.  
p-HMB.- p-hidroximercuribenzoato.  
PMSF.- Fenilmetanosulfonil fluoruro.  
PNC.- Papel de nitrocelulosa.  
SDS.- Duodesil sulfato de sodio.  
TBS.- Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y cloruro de sodio 500 mM.  
TEMED.- N,N,N',N'- tetrametilendiamina.  
Tris.- Hidroximetil aminometano.  
Tween 20.- Polioxietilén Sorvitán Monolaurato.  
Um.- Micrómetros.

R E S U M E N .

Los antígenos de la membrana celular de E. histolytica son importantes en muchas funciones celulares así como en su posible relación con la acción del sistema inmune. Con el objeto de estudiar algunos antígenos de la membrana celular que inducen la formación de anticuerpos, preparamos 15 anticuerpos monoclonales y determinamos la naturaleza química de los epítopes que reconocen. Efectuamos el análisis mediante tratamiento de los antígenos amibianos con: Subtilopeptidasa A y calor en inmunodot, y metaperyodato de sodio en ELISA y Blot. Para efectuar el análisis de carbohidratos, establecimos las condiciones de oxidación en las que usamos Concanavalina A como detector de carbohidratos sobre ovoalbúmina la cual sabemos que contiene carbohidratos y sobre antígenos de amiba. La lectina perdió su reactividad en ambos casos después del tratamiento con peryodato. Para asegurar que el peryodato modificara únicamente los carbohidratos de la amiba hicimos los siguientes controles: anticuerpos policlonales anti-albúmina y un monoclonal anti-actina de amiba, no perdieron su reactividad cuando se efectuaron las oxidaciones. Los resultados muestran que los epítopes de E. histolytica fueron: estables al calor durante una hora a 93°C, resistentes a la enzima Subtilopeptidasa A, y 13 de ellos sensibles al metaperyodato de sodio. El análisis para carbohidratos fue consistente en los dos métodos empleados. Por lo tanto pensamos que los carbohidratos son parte importante de los epítopes estudiados, lo cual es valioso para investigar algunas funciones biológicas como son el reconocimiento y la adhesividad a las células blanco y del sistema inmune.

## I. INTRODUCCION

### 1. ENTAMOEBIA histolytica.

El parásito Entamoeba histolytica (F.A. Lösch, 1875) es un protozoario que pertenece a la familia Entamoebidae, de la clase rizopoda, superclase sarcodina y clase lobosea (30).

El género Entamoeba se encuentra ampliamente distribuido tanto en invertebrados como en peces, anfibios, reptiles, pájaros y mamíferos, además de especies de vida libre.

En el hombre se han aislado 4 especies: Entamoeba gingivalis - de la cavidad bucal y (E. coli, E. hartmani y E. histolytica) del intestino. De todas estas especies solo E. histolytica es patógena (18).

La infección se conoce como amibiasis la cual tiene una distribución mundial y está claramente relacionada con el estado socio-económico y de sanidad más que con el clima (49).

Estimaciones hechas en 1984, sugieren que 500 millones de personas están infectadas con este parásito (69).

E. histolytica puede comportarse como comensal sin inducir signos ni síntomas y a éste estado se le conoce como (amibiasis luminal). Como un patógeno causa la amibiasis invasora. Las amibas virulentas pueden invadir la mucosa intestinal y producir disentería o ameboma, si se extienden a través del torrente sanguíneo da lugar a absceso hepático. En la mayoría de los casos, la amibiasis intestinal se manifiesta como diarrea o disentería y tiene un curso limitado.

El absceso hepático es potencialmente fatal cuando no se trata o diagnostica de manera adecuada (49).

Durante el ciclo de vida de E. histolytica presenta dos estadios principales: El trofozoito y el quiste.

#### Trofozoito

Es de forma elongada con una gran lobopodia anterior y una región uroide posterior.

Las variaciones de pH, osmolaridad y potencial redox, pueden - alterar la forma y motilidad de las células.

Es una célula muy dinámica que mide de 10 a 160 micrómetros de diámetro. El tamaño está relacionado con las diferentes cepas, - pero también depende de las condiciones de alimentación; así por ejemplo las amibas obtenidas directamente de absceso hepático o - de lesiones intestinales, miden cerca de 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro, - mientras que las de los cultivos miden de 7-30  $\mu\text{m}$ .

Contiene un núcleo característico de 3 a 5 micrómetros con una fina cromatina periférica y un núcleo central.

El citoplasma consta de un ectoplasma claro y un endoplasma - granular con numerosas vacuolas. Carece de mitocondrias, aparato de golgi, retículo endoplásmico rugoso, centriolos y microtúbulos (24).

Su vida es muy corta fuera del hospedero y no sobreviven al - ácido clorhídrico y enzimas del tracto gastrointestinal (49).

### Quiste

Es de forma redondeada u oval, mide de 8 a 20 micrómetros de - diámetro. Presenta una pared de quitina, membrana plasmática, ci- toplasma y dependiendo de su madurez contiene de uno a cuatro nú- cleos que es la forma madura (4).

Su pared quitinosa le confiere resistencia hasta por 8 días en el suelo a una temperatura de 28 a 34°C y más de un mes a 10°C, - en cambio mueren a 68°C, mientras que sobreviven a la cantidad de cloro usada normalmente para purificar el agua (20).

### 1a. CICLO DE VIDA.

El ciclo de vida de E. histolytica consta de varios estadios - consecutivos que son: quiste, metaquiste, trofozoito y prequiste.

La forma infectiva es el quiste. La transmisión se presenta cuando un individuo ingiere alimentos contaminados con heces de personas infectadas.

El quiste al llegar al estómago, pierde la quitina. Este proceso de exquistación se puede efectuar en el intestino grueso o delgado.

Los núcleos del quiste se dividen para formar 8 núcleos (estadio de metaquiste), cuya división del citoplasma produce 8 trofozoitos mononucleados (7).

Los trofozoitos que generalmente viven como comensales en el epitelio del intestino grueso del hospedero, pueden producir invasión a tejido.

La enquistación se produce cuando el trofozoito sufre dos divisiones nucleares, su motilidad disminuye, el citoplasma se reduce y ésto se conoce como (estadio de prequiste), entonces tiende a redondearse y se forman los típicos quistes tetranucleados.

Las personas infectadas pueden eliminar hasta un promedio de 45 millones de quistes por día (48).

#### 1b. CITOPATOGENICIDAD DE E. histolytica.

La patogenicidad es definida como la habilidad de un organismo para producir enfermedad en un hospedero (45).

La virulencia de los microorganismos incluyendo los protozoarios es un fenómeno complejo que depende de dos propiedades generales: La invasividad y la toxigenicidad (13).

En el caso de E. histolytica la virulencia se caracteriza fundamentalmente por la destrucción de tejidos infectados y ésto es característica de cada cepa, además del estado inmunológico del paciente (34).

Se ha demostrado que cepas de E. histolytica virulentas pueden matar en 15 minutos el 50% de los leucocitos polimorfonucleares en una proporción de 10 células por cada ameba.

En cambio, las amibas menos virulentas son rápidamente rodeadas y destruidas por neutrófilos humanos.

Los trofozoítos virulentos, sobreviven a concentraciones de más de 1000 polimorfonucleares por amiba (26).

Mediante análisis de biopsias humanas y de tejidos animales infectados experimentalmente así como el uso de modelos in-vitro se han podido identificar dos tipos de mecanismos citopatogénicos.

Uno directo que requiere del contacto entre trofozoítos y células blanco, a éste se le conoce como "Citólisis por contacto".

Se han descrito varios factores que pueden estar implicados en la citólisis por contacto. Tres de ellos se encuentran asociados a una fracción membranal llamada P30 (61).

Tales factores son:

a) tres clases de actividades fosfolipásicas ( $A_1A_2$  y lisofosfolipasas).

b) ácidos grasos libres acumulados durante el lapso de la activación de P30 (68).

Los ácidos grasos libres poseen diversas propiedades biológicas que podrían contribuir al mecanismo citopatogénico de la amibiasis: influyen en la depresión de la respuesta inmune y activan las fosfolipasas endógenas de las células blanco hasta el punto del suicidio (63).

c) Un factor potenciador anfipático (62).

Además de los factores asociados a P30, se ha propuesto que la proteína formadora de poros (amebaporo) podría contribuir a la citólisis por contacto (22). La amebaporo, es una proteína amibiana que tiene todas las propiedades que se requieren para inducir muerte celular: Forma canales iónicos de alta conductancia permeables a sodio, potasio calcio y protones.

Los canales permanecen cerrados, hasta que por estimulación de la amiba, la proteína es liberada e incorporada de manera espontánea dentro de las células blanco (70).

El mecanismo indirecto propone que el efecto citopatogénico se produce por la acción de las citolisininas de origen leucocitario -

para lo cual debe existir un factor amibiano, que induzca la degranulación y lisis de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.

Estudios mediante interacciones de E. histolytica HM1 con células de ovario de hamster (CHO), así como de polimorfonucleares de humano analizados por microscopía electrónica, han demostrado que al contacto de los trofozoítos con las células blanco, provoca una alteración de la membrana de las células blanco. Estas tienden a redondearse, se desadhieren del sustrato, hasta que son fagocitadas por las amibas (56). Algunos autores dicen que las células mueren antes de ser fagocitadas.

Para que se efectúe la citólisis por contacto y se realicen los mecanismos antes mencionados es necesario el reconocimiento celular entre amibas y células blanco. Se ha propuesto que éste reconocimiento sea a través de moléculas a nivel de membrana de la amiba y que éstas moléculas sean del tipo de las lectinas (54) (12) (36).

En el caso de las bacterias, se ha encontrado que muchas especies contienen una lectina en su superficie, la cual puede mediar la adherencia a las células epiteliales (51).

Las lectinas son definidas como glucoproteínas que unen carbohidratos (27).

En 1980, se reportó la purificación y propiedades de una lectina de E. histolytica la cual está presente en varias cepas de amibas. Esta lectina media la adherencia de la amiba a otras células (como eritrocitos y células de ovario de hamster) su actividad es potencialmente inhibida por el azúcar N-acetilglucosamina (52).

Recientemente se encontró que cada cepa de amiba, tiene un patrón específico de adhesión-inhibición por carbohidratos. Así por ejemplo se demostró que para la cepa HK9 el inhibidor más potente es N-acetilgalactosamina, mientras que para la cepa HM38 resulta ser un inhibidor más potente el azúcar N-acetilmanosamina (12). Lo anterior sugiere que estos azúcares están presentes en la superficie de las células blanco y que pueden servir como ligandos

para la lectina de la amiba.

Se han hecho estudios para determinar la relación entre la actividad de la lectina con la adherencia , el grado de eritrofagocitosis y la virulencia de las cepas.(53 ). Al respecto se determinó que que hay una relación directa entre la presencia de la actividad de la lectina en la superficie de los trofozoítos y la eficiencia para adherir eritrocitos ( 54 ).

Existe también una correlación directa entre la velocidad eritrofagocítica y la virulencia, en cambio cepas de diferente virulencia mostraron propiedades de adherencia semejantes. Esta falta de correlación entre adherencia y virulencia se explica porque -- la fagocitosis implica varios eventos, la adherencia es uno de -- esos factores que son previos a la fagocitosis.

## 2. ANTICUERPOS MONOCLONALES

### 2a. ANTECEDENTES

Desde 1847 Henry Bence Jones, encontró que los pacientes que cursaban con mieloma múltiple, excretaban grandes cantidades de proteínas por vía urinaria. Un siglo más tarde, se identificaron como cadenas ligeras de inmunoglobulinas (Proteínas de Bence - Jones). Estas proteínas tienen la característica de ser homogéneas ya que provienen de una sola clona de células plasmáticas que ha proliferado anormalmente (16) (17).

En 1957 Burnet, desarrolló la "Teoría de la Selección Clonal" la cual explica como un animal puede producir anticuerpos capaces de reaccionar específicamente con cada uno de los al parecer, ilimitado número de antígenos (10). Esta teoría propone lo siguiente: Fig. (1).

Los linfocitos inmunocompetentes, portan anticuerpos receptores sobre su membrana celular con especificidad idéntica a los anticuerpos que serán sintetizados por su progenie cuando son activados y diferenciados.

Cada linfocito inmunocompetente porta anticuerpos receptores de especificidad restringida.

Los linfocitos encargados de la síntesis de anticuerpos de cada especificidad, se llevan a cabo durante la diferenciación, antes del contacto con el antígeno.

Los antígenos estimulan clonas específicas para proliferar y diferenciarse en células plasmáticas y en células de memoria, mediante la interacción con sus receptores.

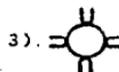
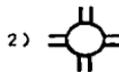
Esta teoría ha sido verificada experimentalmente y se considera el dogma central de la Inmunología.

De acuerdo a esta teoría, cada uno de los anticuerpos es monoclonal, y los anticuerpos presentes en el suero, representan la



Antígeno con dos determinantes que estimulan distintos linfocitos para.

1).  2). 



Los linfocitos proliferan y se diferencian.

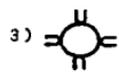
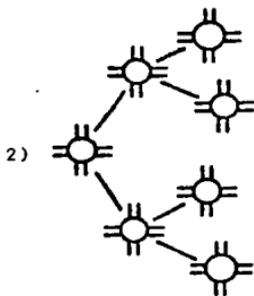
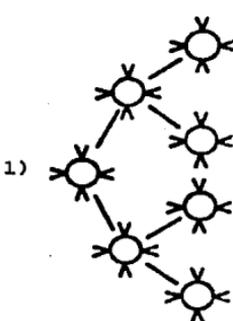


FIGURA 1. LA FIGURA DESCRIBE LA TEORIA DE LA SELECCION CLONAL.

Diferentes determinantes sobre un antígeno, estimula la respuesta de diferentes clonas de linfocitos. Cada anticuerpo porta receptores específicos para cada uno de los determinantes.

suma de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada determinante antigénico.

## 2b. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los principales problemas para el análisis químico de anticuerpos, fueron por un lado, la heterogeneidad estructural del parásito y por el otro la dificultad para obtener material suficiente y homogéneo. Resultados valiosos de inmunoglobulinas se obtuvieron de pacientes con mieloma por ser homogéneas.

Este problema fue superado por Kohler y Milstein en 1975 cuando demostraron que fusionando células de mieloma de ratón con linfocitos B esplénicos de animales inmunizados con un antígeno particular se obtuvieron mielomas-híbridos o "hibridomas" que producen anticuerpos específicos para un solo determinante antigénico.

Los híbridos presentan las siguientes propiedades: el carácter inmortal de las células de mieloma y la capacidad de producir anticuerpos específicos.

Para la producción de anticuerpos, las células híbridas se crecen en cultivos en forma indefinida o se inyectan a animales en la cavidad peritoneal para su producción a gran escala. Cuando son cultivados, se recolecta el sobrenadante y las células pueden congelarse para su recuperación cuando se requiera de más anticuerpos (37) (38) (39).

## 2c. APLICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

La tecnología de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales ha revolucionado la investigación de las ciencias biológicas. En la actualidad, son múltiples las aplicaciones. Algunas de éstas son: Obtención de anticuerpos puros a partir de un antígeno impuro tales como hormonas, enzimas, interferón, etc. (40).

En inmunoensayos para cuantificación de enzimas, hormonas e inmunoglobulinas con fines diagnósticos como gonadotropina coriónica humana en pruebas de embarazo. Para definir los antígenos del sistema de histocompatibilidad, identificación de antígenos para clasificación de linfomas y leucemias (43). También para determinar subpoblaciones celulares funcionales linfoides (59). Con fines taxonómicos en virus, bacterias y parásitos. En el estudio de funciones biológicas por ejemplo anticuerpos contra ciertos antígenos de superficie celular involucrados en actividades de citotoxicidad, de activación celular y de reconocimiento inmune.

#### 2d. ACS MONOCLONALES EN LA CARACTERIZACION DE MOLECULAS QUINICAS

La relativa facilidad con que se obtienen anticuerpos monoclonales para cualquier antígeno, ha permitido emplearlos como instrumento para caracterizar hormonas, péptidos y productos celulares con actividades biológicas como son proteínas, polisacáridos y lípidos.

##### Ejemplo:

Se ha demostrado que los antígenos de Chlamydia trachomatis tiene determinantes que son vitales en la infectividad e inmunopatogénesis de la enfermedad (31).

Empleando anticuerpos monoclonales se realizó la caracterización fisicoquímica de los antígenos específicos de género, especie y subespecie, encontrando que aquellos antígenos específicos de género, parecen ser carbohidratos mientras que aquellos que son específicos de especie y subespecie son de naturaleza proteica, esto ha permitido precisar la clasificación serológica y detectar diferentes especies de Ch. trachomatis (66).

Estudios de reactividad cruzada, indican que los anticuerpos obtenidos de sueros de pacientes con lepra, reconocen una variedad de micobacterias (1) y (41). Por medio de anticuerpos monoclonales 2 de estos están presentes en muchas especies de micobag

terias mientras que los otros dos son de distribución limitada.

La caracterización química indicó que aquellos antígenos de distribución limitada son de naturaleza protéica, aquellos antígenos que se encuentran en muchas especies son carbohidratos. Sin embargo, los cuatro antígenos están involucrados en la respuesta de las células B humanas hacia M. leprae, ya que el suero de pacientes leproso inhibió la unión de anticuerpos monoclonales con cada uno de los 4 antígenos (9).

Los anticuerpos reconocen en los antígenos perfiles de configuración química. De esta manera, establecen unión específica con determinadas moléculas, lo que permite identificar componentes definidos.

Uno de los objetivos de este trabajo, es definir y caracterizar antígenos glucoprotéicos y glucolipídicos de la membrana pasiva de E. histolytica que sea reconocido por anticuerpos monoclonales, ya que se ha sugerido, que los glucoconjugados, son relevantes en el reconocimiento celular (5) (12) (36) (53) (54) (57).

La caracterización de la naturaleza química de antígenos individuales amibianos, será de gran utilidad para diseñar modelos que permitan estudiar el papel de algunas moléculas de E. histolytica en el reconocimiento específico célula efectora-célula blanco, mediante ensayos de interferencia funcional.

## II. OBJETIVO

Determinar la naturaleza química de los epítopes de Entamoeba histolytica reconocidos por anticuerpos monoclonales.

### III. REACTIVOS Y MATERIALES.

#### REACTIVOS.

Suero fetal de bovino de M.A. Bioproducts, suero de ternera de Microlab y TYI-S\_33 (reportado por Diamond) de BBL Biosate. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico: Concanavalina A de Miles-Yeda LTD 79001,  $\text{NaIO}_4$  de J.T. Baker, Yodogen de Pierce,  $\text{I}^{125}$  de New England Nuclear. Peroxidasa de rábano tipo VI (Rz:3), 3-3'-Diaminobenzidina D-5637, alfa-metil D-manósido, O-fenilendiamina P-3888, fenilmetanosulfonil fluoruro P-7626 y Subtilopeptidasa A tipo VIII de sigma Company.

#### MATERIAL

Papel de nitrocelulosa de Scheicher & Shuell Bass, película para rayos X (X-OMAT-X-RP-S) de Kodak México, placas para ELISA (nung) de Thomas Scientific y cámaras de acrílico de 30 carriles.

#### IV. METODOS

##### 1. CULTIVO DE E. histolytica

Se utilizaron trofozoítos de E. histolytica cepa HNI:TMSS la cual fue aislada de un paciente con amebiasis intestinal por Margarita de la Torre (Centro Médico Nacional).

El cultivo axénico se mantuvo a 36.5°C en medio TYI-S-33 (14) suplementado con suero de ternera 15% y mezcla vitamínica de Diamond 1.5%.

Los trofozoítos se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento. Para despegar las células de los tubos de cultivo, se mantuvieron a 4°C durante 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 250 g por 3 minutos. Las amibas se lavaron dos veces con amortiguador de fosfato de potasio 15 mM pH 7 y cloruro de sodio 175 mM (PBS-A). En cada lavado las amibas se empaquetaron por centrifugación y el sobrenadante se eliminó.

##### 2. OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Ratones de la cepa Balb/c de aproximadamente 8 semanas de edad se inmunizaron con  $1 \times 10^5$  trofozoítos de E. histolytica cepa HNI - en 100  $\mu$ l de PBS-A. Cada inmunización se realizó por vía intraperitoneal a intervalos de dos semanas. Los ratones se desangraron 10 días después de la última inmunización.

Los conejos y ratones normales también se sangraron para la obtención del suero. La sangre de los animales normales así como la de los inmunizados se centrifugó a 500 g durante 5 minutos. Las células se separaron por sedimentación. El título de los sueros y antisueros se determinó por ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

Finalmente los sueros se guardaron en alícuotas congelados a -20 C hasta su uso.

### 3. ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI- E. histolytica.

Los anticuerpos monoclonales fueron previamente obtenidos en el laboratorio (11).

Se fusionaron células de la línea mielóide P3-X63-A68-6.5.3. con linfocitos B esplénicos de ratones Balb/c inmunes contra la membrana plasmática de E. histolytica. La fusión se efectuó con polietilenglicol (PEG-400) al 50%.

Los productos de la fusión se distribuyeron en placas para cultivo de 96 pozos con fondo plano. Se adicionaron células alimantadoras en una proporción de  $10^6$  timocitos por mililitro de suspensión celular bazo/mieloma.

El medio de cultivo usado fue Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 20% de suero fetal de bovino (FBS) 2mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 50 u/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina.

Las células híbridas se seleccionaron agregando al medio de cultivo hipoxantina aminopterina timidina (HAT) en DMEM suplementado con 20% de FBS. Después de 10 días se recolectaron los sobrenadantes de las colonias que tenían  $10^5$  células y se determinó por ELISA la presencia de anticuerpos contra antígenos totales de E. histolytica.

Los cultivos secretores de anticuerpos anti-amiba, fueron clonados 3 veces consecutivas por dilución limitante a 1 célula por pozo.

Posteriormente se caracterizó el isotipo de los anticuerpos monoclonales, el patrón de tinción en amibas fijadas y el peso molecular de los antígenos reconocidos por dichos anticuerpos.

En este trabajo, se emplearon 15 clonas productoras de anti-  
cuerpos que son: A57, A14A12, A35, A8, C6, F9, D4, 1D10, 2F11, -  
6G9, 5B6, 1H8, 6H3, D12 y D10.

#### 4. ENSAYO INMUNENZIMATICO EN FASE SOLIDA (ELISA).

##### 4a. PREPARACION DE ANTIGENO.

Se cosecharon y lavaron  $1 \times 10^6$  trofozoítos de E. histolytica -  
cepa HM1, se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de fosfato de  
potasio 15 mM pH 7 y cloruro de sodio 154 mM (PBS) que contenía -  
p-hidroximercuribenzoato (p-HNB) 2.5 mM como inhibidor de tiolpro-  
teasas (6). Las células se lisaron mediante 3 ciclos de conge-  
lación-descongelación en una mezcla de hielo seco-acetona.

Se tomó una alícuota para determinación de proteínas por el método  
de Lowry (44) y el homogeneizado restante se almacenó a -  
-20°C hasta su uso.

##### 4b. DETECCION DE ESPECIFICIDADES.

Se utilizaron placas microtituladoras "NUNG" de poliestireno -  
con 96 pozos. En cada pozo de la placa se adsorvieron 50  $\mu$ l de -  
antígeno de amiba a 25  $\mu$ g/ml en PBS, incubando por dos horas a -  
37°C. El antígeno no unido a la placa se removió con PBS conte-  
niendo Tween 20 al 0.05 % (solución de lavado).

Los sitios libres del poliestireno se saturaron con 50  $\mu$ l/pozo  
de gelatina al 0.5 % en PBS durante 1 hora de incubación a 37°C.

Las placas así tratadas se expusieron a los siguientes ligandos.

##### Primer Ligando.

Como primer ligando se usaron antisueros de conejo y de ratón,  
anticuerpos monoclonales y Concanavalina A.

La concanavalina A (Con A) se utilizó como ligando detector de

glucoconjugados debido a su capacidad de unirse específicamente a los carbohidratos como manosa y glucosa. La Con A es una lectina que puede tener 2 ó 4 sitios de unión para el azúcar de acuerdo a su estado de agregación. De ésta manera la Con A se une a glucoconjugados previamente adsorvidos a la placa de poliestireno y le quedan aún sitios activos que pueden unir otros carbohidratos (8).

La peroxidasa es una glucoproteína que es reconocida por la Con A por lo que la empleamos como segundo ligando para detectar la Con A. Fig. 2a.

### Segundo Ligando.

El segundo ligando que se utilizó para detectar los anticuerpos monoclonales y para el antígeno fue Igs de caprino-anti-Igs de ratón conjudos a peroxidasa. Fig. 2b.

La unión de la Con A se detectó con peroxidasa de rábano, como se explicó anteriormente.

La exposición de éstos ligandos se efectuó durante dos horas a 37°C seguida de una aspiración para quitar el exceso y removerlo con solución de lavado.

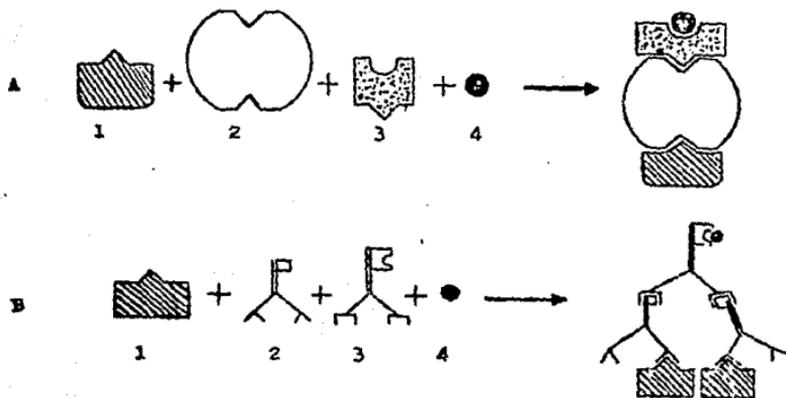
Finalmente se reveló la actividad enzimática de la peroxidasa usando como sustrato 50 µl/pozo de o-fenilendiamina  $2.7 \times 10^{-3}$  M,  $H_2O_2$  0.01 % en amortiguador de citratos  $3.7 \times 10^{-3}$  M pH 6.2. La reacción se efectuó en la obscuridad a 37°C hasta la aparición de color naranja en el control positivo.

Para suspender la reacción enzimática se agregó 50 µl/pozo de  $H_2SO_4$  4N.

Los resultados se analizaron de manera visual.

## 5. CONTROL DE OXIDACION DE LOS CARBOHIDRATOS DE E. histolytica MEDIANTE ELISA.

Pozos con antigenos glucoprotéicos (antígeno de umiba y - - -



**FIGURA 2. DETECCIÓN DE GLUCOCONJUGADOS Y ANTICUERPOS CONTRA AMIBA POR EL METODO DE ELISA.**

1, antígeno de ameba; 2a, Concanavalina A; 2b, primer ligando (suero de ratón inmune contra E.histolytica o sobrenadante de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales); 3a, peroxidasa; 3b, Igs de cabra-anti-Igs de ratón conjugadas a peroxidasa; 4, O-fenilendiamina.

ovalbumina) unidos a la placa fueron tratados con  $\text{NaIO}_4$  25 mM, - 50 mM y 100 mM en amortiguador de tris-HCl 20 mM pH 7.5 y cloruro de sodio 500 mM (TRIS).

La oxidación se efectuó durante 24 horas a  $4^\circ\text{C}$  (58). Como primer ligando se añadieron 50  $\mu\text{l}$ /pozo de Con A 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  disuelta en 0.3% de gelatina y Buffer A que consiste de  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  - 0.25 mM,  $\text{NaCl}$  154 mM y Tween 20 0.05 %.

Pozos no tratados con  $\text{NaIO}_4$  y expuestos a Con A, se utilizaron como controles positivos, el control negativo consistió de pozos no tratados con el oxidante y expuestos a Con A previamente bloqueada con alfa-metil-D-manosido (alfa-MM) 250 mM.

La Con A unida a carbohidratos de la amiba, se expuso a 50  $\mu\text{l}$  por pozo de peroxidasa de rábano 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  diluida en Buffer A y gelatina 0.3%. La actividad enzimática de la peroxidasa se reveló con o-fenilendiamina como se describió anteriormente.

#### 6. RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS DE E. histolytica POR ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Una vez que el antígeno se adsorbió a la placa y se saturaron los sitios libres de ésta con gelatina, la placa se dividió en - dos partes A y B.

Los antígenos de la parte A, se trataron con  $\text{NaIO}_4$  50 mM por 24 - horas a  $4^\circ\text{C}$ , mientras que los pozos de la parte B no fueron tratados.

Posteriormente se expusieron a los sobrenadantes de cultivo de - los híbridos productores de anticuerpos monoclonales en diluciones cuartas seriadas hasta 1/256.

Como control negativo, se colocó en las dos partes de la placa - sobrenadante de un híbrido (8D10) con especificidad para el sistema nervioso del acocil (langostino de río), donado por Elizabeth Becerra del CINVESTAV.

Los anticuerpos monoclonales se incubaron tanto con los antige

nos oxidados como con los no oxidados.

Las inauoglobulinas unidas específicamente se detectaron mediante el conjugado peroxidasa-anti-Igs de ratón, diluido 1:2000 en PBS-gelatina 0.5%-Tween 20 0.05%.

El conjugado unido se detectó con o-fenilendiamina que es sustrato de la peroxidasa.

Las lecturas se realizaron de manera visual.

#### 7. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS PARA ELECTROFORESIS.

El paquete celular previamente lavado, se resuspendió a una densidad celular de  $12-15 \times 10^6$  amibas por mililitro en tris 100 mM con (p-HNB) 100 mM como inhibidor de tior proteasas (6), se agitó en vortex por 5 minutos para tomar una alícuota de 50  $\mu$ l y determinar proteína mediante el método de Lowry (44).

El extracto se diluyó 1:1 con amortiguador de muestra 2x para electroforesis que contenía tris-HCl 0.625 M pH 6.8, duodecil sulfato de sodio (SDS) 2.5% glicerol 10% y azul de bromofenol. 0.01%. Inmediatamente se sometió a ebullición durante 5 minutos en baño maría. Se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta la corrida electroforética.

Antes de usarlo se le añadió 2-mercaptoetanol para tener una concentración final de 5%, se hirvió durante un minuto y centrifugó a 800 g por un minuto.

#### 8. ELECTROFORESIS DE ANTÍGENOS DE E. histolytica EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

##### Preparación de Geles

La electroforesis se efectuó en geles de poliacrilamida con SDS (42) de 9 x 15 cm y 1.5 mm de espesor.

Las concentraciones finales de los geles fueron las siguientes: para el gel separador acrilamida 7.5%, N,N'-bis-metilenacrilamida

0.2%, tris-HCl 0.376 M pH 8.8, SDS 0.1 %, persulfato de amonio - 0.3 % y N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TENED) 0.05%. Para el gel concentrador se utilizó acrilamida 3 %, N,N'-bis-metil-acrilamida 0.08 %, tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 0.1 %, persulfato de amonio 0.03 % y TENED 0.05 %.

### Corrida Electroforética

Se precorrió el gel separador durante 30 minutos a corriente constante de 25 mA en amortiguador de tris 0.025 M, glicina - - 0.192 M pH 8.3 y SDS 0.1 %.

Enseguida se preparó el gel concentrador quedando en la parte superior de el gel separador. Una vez gelificado se depositaron las muestras separadas por un carril que contenía los marcadores de peso molecular.

Se aplicó una corriente constante de 15 mA, la cual fue interrumpida cuando el colorante indicador de corrida (azul de bromofenol) migró a 0.5 cm del borde inferior del gel.

Se desmontó el gel de la cámara y se preparó para la electrotransferencia.

### 9. ELECTROTRANSFERENCIA DE ANTIGENOS DE E. histolytica A PAPEL DE NITROCELULOSA (PNC).

El gel de poliacrilamida SDS que contenía los antígenos de - - E. histolytica separados electroforéticamente, se transfirió a - PNC como lo describió Towbin y col., 1979, (67).

El PNC se puso en contacto con el gel previamente equilibrado durante una hora con amortiguador de transferencia que contenía - tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% v/v. A cada lado de la unidad PNC-gel se adosó un filtro watman No. 3, una fibra doméstica "scotchbrite" y un soporte de plástico formado por un - - "Sandwich" sostenido por dos ligas.

La unidad se formó con los componentes húmedos evitando la presencia de burbujas entre PNC y el gel.

La electrotransferencia se realizó con amortiguador de transferencia en una cámara donde el PNC quedó orientado hacia el ánodo. Se aplicó un voltaje constante de 75 voltios en una fuente Bio-Rad a 4°C durante 16 horas.

#### 10. TINCION DE PROTEINAS EN PNC.

Se cortó una tira de PNC con 1 cm correspondiente a los marcadores de peso molecular y se tiñó con negro de amido al 0.1 % en ácido acético 2 % durante 5 minutos, posteriormente se lavó con ácido acético 2 % calentado a 90°C y se secó a temperatura ambiente (15).

Otra tira de 0.6 cm que correspondía a el patrón de antígeno total de E. histolytica se tiñó con tinta India de acuerdo a Henkcock y Tsang, 1983 (28). La tira de PNC se lavó 3 veces mediante incubaciones de 10 minutos con PBS-TWEEN 0.3 %. Al término de los lavados se agregó tinta India en una concentración de 1 µl/ml de PBS/TWEEN 0.3 % incubando de 2 a 18 gotas hasta la aparición de las bandas.

Finalmente la tira se lavó con agua desionizada y se secó a temperatura ambiente.

#### 11. OXIDACION DE CARBOHIDRATOS DE E. histolytica EN PNC.

Antígenos de E. histolytica previamente separados por electroforesis y transferidos a papel de nitrocelulosa se trataron de la manera siguiente:

Se cortaron 3 tiras de PNC de 0.4 cm de ancho y se colocaron en una cámara de acrílico en carriles separados.

Los sitios libres del papel que no contenían proteínas de la ameba, fueron saturados por la adición de una solución que conte-

nia albúmina de bovino (BSA) 3 % p/v y gelatina 0.3 %. Se agitó constantemente por espacio de dos horas a temperatura ambiente.

La tira N. 3 fue tratada con  $\text{NaIO}_4$  0.03 N en (TBS) por 18 horas a temperatura ambiente y con constante agitación.

Las tiras 1 y 2 se trataron en las mismas condiciones pero con  $\text{NaIO}_4$ .

El metaperyodato de sodio se separó de las tiras mediante aspiraciones y lavados con Buffer A.

Como ligando detector de carbohidratos de la amiba fue utilizada Con A 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  diluida en Buffer A con gelatina 0.3 %.

La Con A se hizo interaccionar con la tira 3 y con la 1 que se usó como control positivo.

Para el control negativo, la tira N. 2 se incubó con Con A a la que se le bloquearon previamente sus sitios de unión para carbohidratos con alfa-MM 250 mM.

La unión de éstos ligandos fué efectuada 2 horas a temperatura ambiente, agitando constantemente. El exceso de los reactivos fue removido lavando con Buffer A.

Para detectar la Concanavalina A unida a carbohidratos de la amiba se adicionó peroxidasa de rábano 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Buffer A y gelatina 0.3 %. La unión se permitió por dos horas a temperatura ambiente al final de éste tiempo, la peroxidasa no unida se eliminó lavando las tiras con Buffer A.

La peroxidasa unida específicamente a la Concanavalina A se detectó con Diaminobenzidina en una concentración de 0.03 % de tris HCl 60 mM y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.06 %.

La reacción transcurrió en la obscuridad, durante 15 minutos a temperatura ambiente.

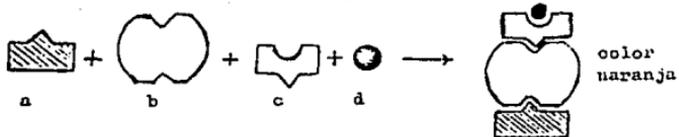
Finalmente las tiras fueron lavadas con Buffer A y analizadas con respecto a los controles (positivo tira 1 y negativo tira 2)

Fig. 3.

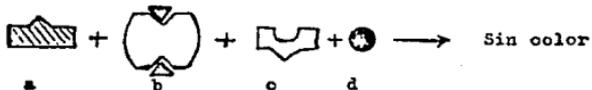
## 12. RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS DE E. histolytica POR ANTICUERPOS MONOCLONALES EN PNC.

Se cortaron 36 tiras de PNC de 0.4 cm con antígenos previamente transferidos. Se colocaron en una cámara de acrílico con carri

1.- Control positivo.



2.- Control negativo.



3.- Oxidacion.

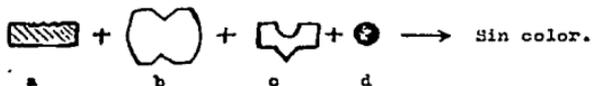


FIGURA 3. DIAGRAMA DE LA OXIDACION DE CARBOHIDRATOS DE E.histolytica en PNC.

a, antígeno; b, Con A; c, Peroxidasa; d, diaminobenzidina  
2b, Con A bloqueada con alfa-NM; 3a, antígeno tratado con  $\text{NaIO}_4$  0.03%.

Todas las tiras se saturaron con una solución que contenía BSA - 3 % p/v gelatina 0.3 % en PBS. La saturación se efectuó durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante.

18 tiras se sometieron a la oxidación con  $\text{NaIO}_4$  50 mM en TBS - por 18 horas a temperatura ambiente. Las tiras restantes se mantuvieron el mismo tiempo con TBS.

Al final de la oxidación se realizaron lavados con Buffer A para extraer el peryodato libre.

Posteriormente todas las tiras se expusieron a los siguientes ligandos:

#### Primer Ligando

Se emplearon 15 anticuerpos monoclonales: A8, C6, F9, D4, 1D10, 2F11, 6G9, 5B6, 1H8, 6H3, D12 y D10.

Antes de su uso, se detectó reactividad positiva por ELISA contra antígenos totales de E. histolytica. El control positivo fué un anticuerpo policlonal de ratón inmune contra E. histolytica y el control de éste, un suero normal de ratón. Como control negativo se utilizó el anticuerpo monoclonal 8D10 irrelevante en éste sistema.

Los 15 anticuerpos monoclonales y los 3 controles, se expusieron tanto a las 18 tiras oxidadas como a las no oxidadas. La incubación de los ligandos se permitió durante dos horas a temperatura ambiente y con agitación constante. Enseguida se lavó por 3 veces con (PBS/TWEEN 0.05 %) mediante incubaciones de 10 minutos.

#### Segundo Ligando

Se utilizó Igs de conejo anti-Igs de ratón marcada con  $I^{125}$  - por el método de yodogen (46).

Cada tira de PNC se incubó con  $I^{125}$ -Igs de conejo-anti-Igs de ratón a razón de  $2 \times 10^5$  cuentas por minuto por mililitro (cpm/ml) diluida en solución de lavado por dos horas a temperatura ambiente.

Las tiras de PNC se secaron y se expusieron a películas de rayos X-Kodak X-omat (x-k1).

13. RECONOCIMIENTO DE PROTEINAS DE E. histolytica POR ANTICUERPOS MONOCLONALES MEDIANTE INNUNODOTT.

A. Antígeno preparado para electroforesis en una concentración de 250 µg/ml se le añadió 250 µg de la enzima subtilopectidasa A a 37°C durante dos horas. Posteriormente se le agregó fenilmetano-sulfonil fluoruro (PNSF) 2 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente para inhibir la enzima.

Se cortaron 19 tiras de PNC de 2x 0.8 cm. En la parte superior de éstas se colocó 5 µl del antígeno tratado con la enzima. En la parte inferior se colocó 5 µl de antígeno no tratado.

Las tiras se secaron a temperatura ambiente y se colocaron en una cámara de acrílico.

Para eliminar el antígeno no unido al papel, se realizaron lavados mediante aspiraciones con solución de lavado.

Se ensayaron los anticuerpos monoclonales (A57, A14A12, A35, A8, C6, F9, D4, 1D10, 2F11, 6G9, 5B6, 1H8, 6H3, D12 y D10) con los siguientes controles: Suero normal de ratón, suero de ratón inmune contra E. histolytica, anticuerpos monoclonales anti-actina y 8E4 anti- el sistema nervioso del acocil.

B. Por otro lado, en 19 tiras de PNC de 2x0.8cm, se colocaron 5 µl de antígeno preparado para electroforesis a una concentración de 250 µg/ml. En cada tira se colocaron 2 gotas de antígeno sin tratar y en la inferior, antígeno calentado a 100°C durante una hora.

Se dejaron secar las gotas a temperatura ambiente y enseguida se lavaron las tiras con solución de lavado para eliminar el antígeno no unido al papel. Los anticuerpos monoclonales que se probaron fueron (A8, A57, A35, A14A12, C6, 1D10, D10, D12, F9, D4, 2F11, 5B6, 1H8 y 6H3) con los controles (suero normal de ratón, suero de ratón inmune contra E. histolytica y el anticuerpo monoclonal 8E4).

La actividad de los anticuerpos monoclonales, tanto con los antígenos tratados con la enzima como con los tratados mediante calor, fue revelada con un segundo anticuerpo (Igs de conejo anti-Igs-de ratón marcada con I<sup>125</sup>).

La unión de éstos ligandos se realizó como se describió en el ensayo para el reconocimiento de carbohidratos de E. histolytica en PNC.

## V. RESULTADOS .

### 1. OXIDACION DE CARBOHIDRATOS DE E. histolytica.

Con el objeto de demostrar la oxidación de los carbohidratos de E. histolytica por ensayo inmunoenzimático en fase sólida ELISA, se utilizó como primer ligando una lectina ( Con A) que es capaz de unirse, por un lado a los carbohidratos de la amiba y por el otro a la glucoproteína peroxidasa (8).

La actividad enzimática de la peroxidasa se detectó con o-fenilendiamina que da lugar a un producto colorido como se puede observar en la fig 4. Los carbohidratos del extracto de E. histolytica unen a la Con A y por lo tanto a la peroxidasa, observándose un color naranja como producto de la reacción enzimática, pozos B y C (7-9) control positivo. Cuando los sitios de la lectina bloquearon con el azúcar alfa-MM, ésta no se unió a los carbohidratos de la amiba y por lo tanto no se observó desarrollo del color, pozos F y G (1-12) control negativo.

La peroxidasa en una concentración de 0.01 ug/ml pozos D y E (1-12) no desarrolló color por sí sola, durante el tiempo en que apareció éste en el control positivo, lo cual indica que el desarrollo del color en el control representa la unión específica de la peroxidasa a la Con A y ésta a los carbohidratos de la amiba.

Se ensayaron diferentes concentraciones de  $\text{NaIO}_4$  ( 25mM, 50mM y 100 mM ).

A una concentración de 25 mM pozos B y C (1-3), existe una ligera coloración naranja comparada con el control negativo, lo cual indica que con ésta concentración de  $\text{NaIO}_4$  aún existen carbohidratos sin oxidar y son detectados por la Con A (como en el control positivo). La coloración desapareció cuando se usó  $\text{NaIO}_4$  50 mM pozos B y C (4-6). Por lo tanto, 50 mM de  $\text{NaIO}_4$  fue la concentración mínima necesaria para que los carbohidratos dejen de reaccionar con la Con A.

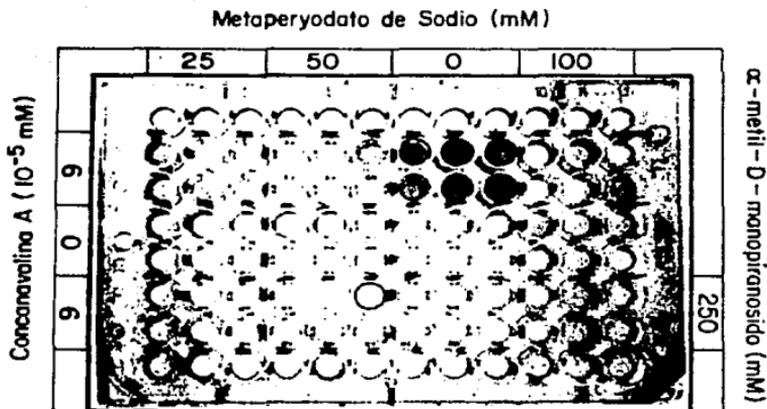


FIGURA 4. OXIDACION DE CARBOHIDRATOS DE E. histolytica

Los carbohidratos de E. histolytica se detectaron con Concanavalina A en un ensayo tipo ELISA. Las oxidaciones del antígeno se efectuaron en placas microtituladoras de 96 pozos, con diferentes concentraciones de  $\text{NaIO}_4$ .

Pozos	Peryodato.
B a G ( 1-3 )	25 mM
B a G ( 4-6 )	50 mM
B a G (10-12)	100 mM
B a G ( 7-9 )	0 mM

El primer ligando consistió de:

Concanavalina A	B y C (1 - 12)
Con A (bloqueada con alfa-MM)	F y G (1 - 12)
Pozos con solo el segundo ligando	D y E (1 - 12)
Pozos con PBS y ningún ligando.	A y H (1 - 12)
Peroxidas Segundo ligando.	B a G (1 - 12)

## 2. EFECTO DE $\text{NaIO}_4$ SOBRE UNA PROTEINA (BSA).

Se ha reportado que durante las oxidaciones con peryodato, dependiendo de las condiciones de temperatura, tiempo y la concentración del peryodato, las proteínas pueden sufrir modificaciones no atribuibles a la oxidación de carbohidratos (23).

Para determinar si en las condiciones en que efectuamos la oxidación de los carbohidratos de la amiba, las proteínas se modifican realizamos un experimento tratando BSA con peryodato 50 mM durante 24 horas a 4 C.

El primer ligando fue suero de conejo anti-BSA y el control negativo suero normal de conejo.

En la fig 5, se observa que los pozos E y F (2-11) desarrollaron un color naranja que disminuye su intensidad cuando la dilución es mayor. Esta misma intensidad de color se observa cuando la BSA es tratada con peryodato, pozos B y G (2-11). En ambos casos el suero de conejo anti-BSA dió un título de 1:32000 analizado de manera visual con respecto al control negativo pozos D y E (2-11).

## 3. RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS DE E. histolytica POR ANTICUERPOS MONOCLONALES MEDIANTE ELISA.

Después de establecer las condiciones de oxidación con peryodato en el sistema ELISA, se probaron 15 anticuerpos monoclonales para determinar si reconocen carbohidratos de la amiba; cada anticuerpo se incubó con antígeno de E. histolytica no tratado y tratado con peryodato. Los anticuerpos monoclonales (F9, A8, C6, A57, A14A12, D4, 5B6, 1H8, 6H3, D10, A35, 6g9, 1010, D12, y 2F11) dieron un título de 1:256 cuando fueron incubados con antígenos no tratados Fig. 6, Fig 7 y Fig 8. Las lecturas se realizaron de manera visual y con respecto al anticuerpo monoclonal 8D10 que es el control negativo. Cuando el antígeno estaba tratado con peryodato, se observa que los Acs monoclonales F9, A8 y C6 perdieron su actividad por completo, en cambio A57 y A14A12 solo disminuyeron su título de 1:256 a 1:16 con respecto al control negativo.

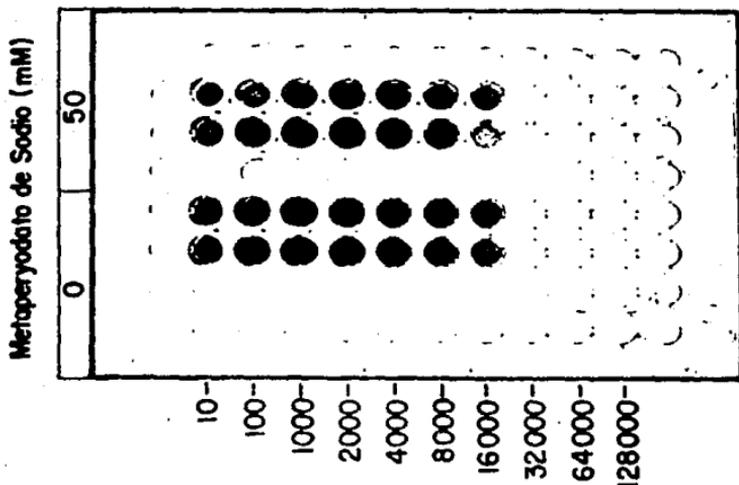


FIGURA 5. EFECTO DE  $\text{NaIO}_4$  SOBRE UNA PROTEINA QUE NO CONTIENE CARBOHIDRATOS.

Todos los pozos se forraron con BSA 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Los pozos B y G (2-11) fueron tratados con  $\text{NaIO}_4$ , mientras que los pozos E y F (2-11) se mantuvieron como controles. El primer ligando fue suero de conejo anti-BSA en diferentes diluciones (los números en las abscisas representan los inversos de las diluciones empleadas). Los pozos D y G (2-11) son controles en los cuales el segundo ligando es suero normal de conejo. Las líneas A, H, I y J - son controles cuyos ligandos fueron sustituidos por PBS.

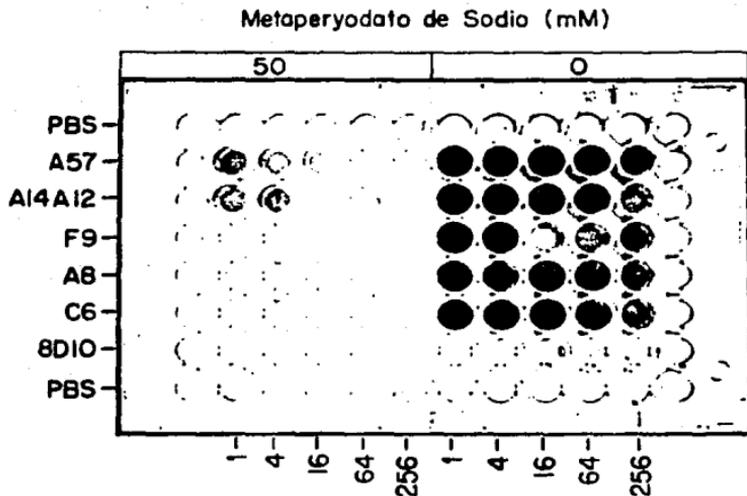


FIGURA 6. RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS DE *E. histolytica* POR LOS MONOCLONALES : A57, A14A12, F9, A8 y C6.

El antígeno total de *E. histolytica* tratado con  $\text{NaIO}_4$  pozos B-G(2-6) y el no tratado pozos B-G(7-11) se expusieron a los anticuerpos monoclonales (A57, A14A12, F9, A8 y C6). Se utilizaron diluciones cuartas comenzando con el sobrenadante concentrado (1) hasta 1/256. (en la figura está indicado como los inversos de las diluciones).

Los controles negativos son: el anticuerpo monoclonal 8D10 que reconoce el sistema nervioso del acocil y PBS que indica la oxidación espontánea de la o-fenilendiamina, empleada como sustrato de la peroxidasa

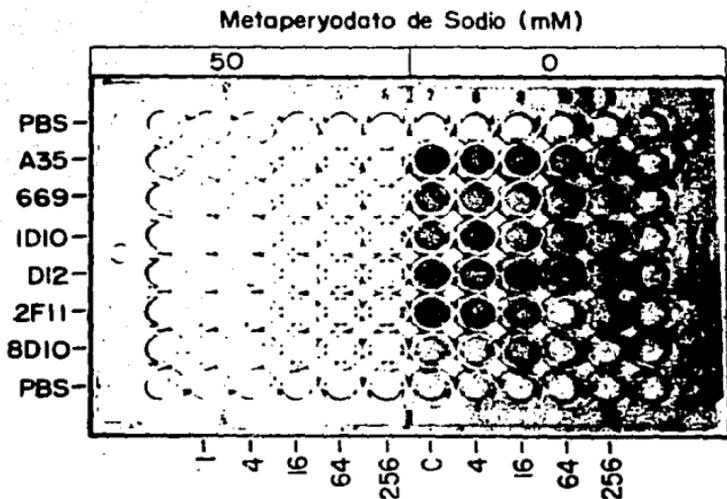
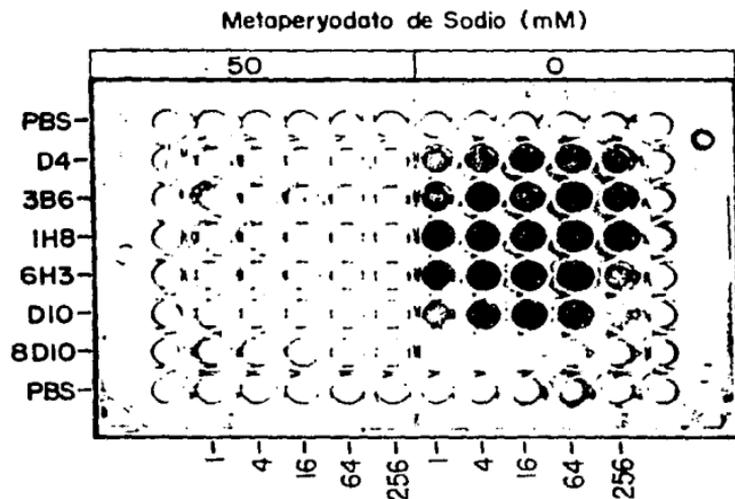


FIGURA 7. RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS DE E. histolytica POR LAS MONOCLONALES : A35, 609, 1D10, D12 y 2F11.

En éste ensayo, se probó la reactividad de los anticuerpos monoclonales (A35, 609, 1D10, D12 y 2F11) frente a antígenos de E. histolytica tratados y no tratados con  $\text{NaIO}_4$ .

Se utilizaron las mismas condiciones, acomodo de muestras y controles que se indican en la figura 6.



**FIGURA 8. RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS DE *E.histolytica* POR LOS MONOCLONALES: D4, 5B6, 1H8, 6H3 y D10.**

Este ensayo, indica la reactividad de los anticuerpos monoclonales (D4, 5B6, 6H3, y D10) contra antígenos de *E.histolytica* tratados y no tratados con metaperyodato de sodio.

Se utilizaron las mismas condiciones de organización que se indican en la figura 6.

Todos los demás anticuerpos ensayados (D4, 5B6, 1H8, 6H3, 3D10 A35, 6C9, 1D10, D12 y 2F11) dejaron de reaccionar por el efecto del peryodato, Figs 7 y 8.

#### 4. PATRON ANTIGENICO DE EXTRACTO TOTAL DE E. histolytica.

Se preparó extracto total de E. histolytica para electroforesis y se definió el patrón de este preparado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS 7.5% y se transfirió a papel de nitrocelulosa.

Como se muestra en la fig. 9, se definieron varias bandas polipeptídicas del extracto, tanto en gel (carril 3) como en el papel de nitrocelulosa (carril 4). Estas bandas se encuentran en el intervalo de peso molecular de 17 a 116 kd como se puede observar en los carriles 1 y 2. Los marcadores de peso molecular en el papel de nitrocelulosa fueron teñidos con negro de amido (15), y las bandas polipeptídicas con tinta India que es más sensible.

Tanto el patrón polipeptídico como los marcadores de peso molecular fueron revelados con azul de Coomazie.

#### 5. OXIDACION DE CARBOHIDRATOS DE E. histolytica EN PNC.

Proteínas de E. histolytica y ovoalbúmina se electrotransfrieron a papel de nitrocelulosa y se realizó una oxidación con peryodato 0.03M durante 18 horas a temperatura ambiente.

En el carril 1 y 1' de la fig 10, se observan las bandas que son detectadas por la presencia de Con A unida a los carbohidratos de la ovoalbúmina y de la amiba respectivamente. (control positivo). Estas bandas desaparecen cuando el antígeno y la ovoalbúmina son previamente oxidados con peryodato (carril 3 y 3').

De la misma manera desaparecen las bandas del antígeno de amiba y de ovoalbúmina, cuando se bloquearon los sitios de unión de la Con A con alfa-MM. Carril 2 y 2' (control negativo).

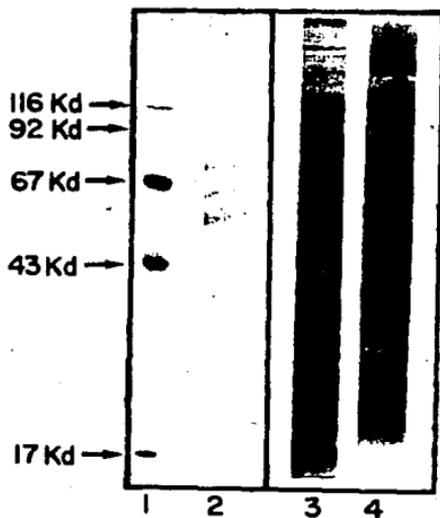


FIGURA 9. PATRON ANTIGENICO DE EXTRACTO TOTAL DE E. histolytica. Proteínas totales de E. histolytica se electrotransfirieron de geles de poliacrilamida-SDS a Papel de Nitrocelulosa (PNC).

Los carriles 1 y 3 contienen las proteínas corridas en gel y los carriles 2 y 4 transferidas en PNC.

Las tiras 3 y 4 corresponden al extracto total de E. histolytica -- las tiras 1 y 2 a los marcadores de peso molecular que son las proteínas: Mioglobina 17 Kd, Ovoalbúmina 43 Kd, BSA 67 Kd, Fosforilasa 92 Kd y Beta-galactosidasa 116 Kd.

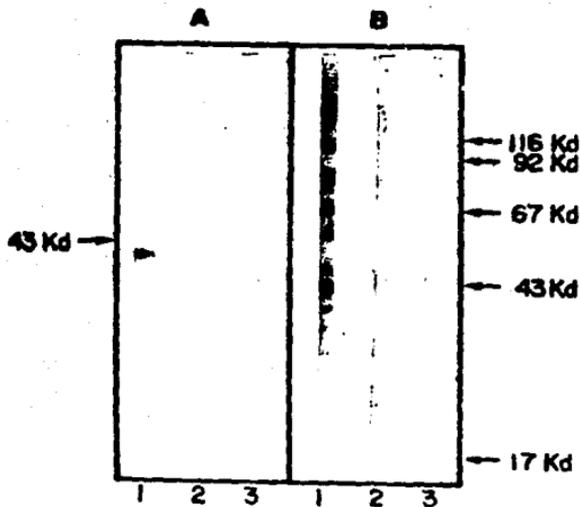


FIGURA 10. OXIDACION DE CARBOHIDRATOS DE *E.histolytica* EN PNC.

Los carriles 1,2,3 y 1'2'3' son tiras de PNC que contienen ovoalbúmina y antígeno total de *E.histolytica* respectivamente. Las tiras-3 y 3' se trataron con  $\text{NaIO}_4$  30 mM durante 18 horas a temperatura ambiente.

Tiras 1 y 1'.- Se trataron sucesivamente con Con A y peroxidasa. Estos son controles positivos que indican que los carbohidratos pueden detectarse en éste sistema.

Tiras 2 y 2'.- Se trataron con Con A bloqueada con alfa-MM y peroxidasa. La ausencia de reactividad indica la no unión de Con A.

## 6. EFECTO DEL METAPERIODATO DE SODIO SOBRE LA ACTINA DE E. histolytica

Para determinar si existe modificación de las proteínas de la ameba cuando se efectúan oxidaciones con periodato en papel de nitrocelulosa, se ensayaron dos proteínas: actina de cerebro de rata y proteínas de E. histolytica previamente electrotransferidas a PNC y se trataron con periodato en las mismas condiciones de temperatura, tiempo y concentración en que se realizó la oxidación para carbohidratos de la ameba ( fig 11).

La actina es una proteína de peso molecular de 43 Kd. En la autorradiografía de la fig 11, se demuestra la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-actina de cerebro de rata ya que reconoce una banda de 43 Kd correspondiente al peso molecular de la actina ( carril 1).

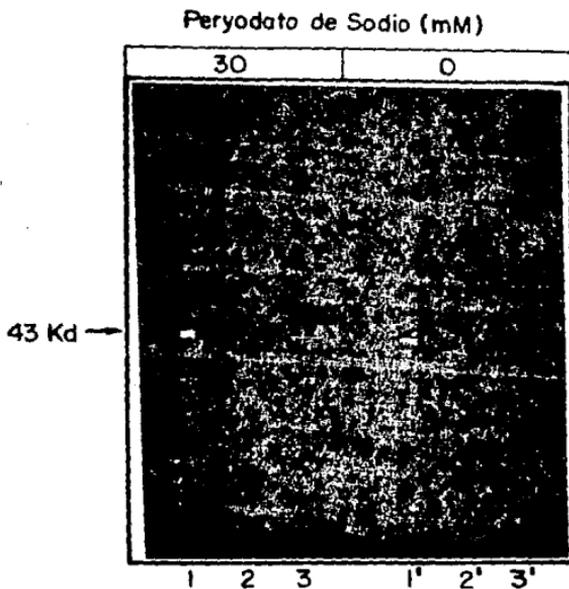
Este mismo anticuerpo monoclonal reconoce también la actina de ameba ( carril 3).

El carril 2 contiene el control negativo que consiste de actina de cerebro de rata y el anticuerpo monoclonal D12 anti-E. histolytica. Como se puede observar, no aparece ninguna banda.

Después de que las actinas tanto de ameba como de cerebro de rata son tratadas con periodato, ( carriles 1'2' y 3' ), el anticuerpo monoclonal anti-actina las sigue reconociendo con la misma intensidad que cuando no son tratadas. ( carriles 1,2 y 3).

## 7. RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS DE E. histolytica POR ACS MONOCLONALES.

Los anticuerpos monoclonales (A8, C6, F9, 1D10, 6G9, D12, D4 2F11, 5B6, 1H8, 6H3 y D10), cuando son expuestos a extractos totales de E. histolytica como el patrón que se muestra en la fig. 9 reconocen una banda polipeptídica de peso molecular menor de 20,000 daltones (11).



**FIGURA 11. EFECTO DEL METAPERIODATO DE SODIO SOBRE LA ACTINA DE E.histolytica .**

Se electrotransfirieron actina de cerebro de rata y extracto de E.histolytica y fueron expuestas a los siguientes ligandos:

Carriles	Proteinas Transferidas	Primer Ligando
1 y 1'	Actina de cerebro de rata	Ac. monoclonal anti-actina
2 y 2'	Actina de cerebro de rata	Ac. monoclonal D12 anti-amiba
3 y 3'	Proteinas de <u>E.histolytica</u>	Ac. monoclonal anti-actina

Los tiras (1, 2 y 3) se trataron con  $\text{NaIO}_4$  30 mM por 18 horas a temperatura ambiente. Los tiras (1; 2; y 3') no fueron tratadas.

Estos anticuerpos monoclonales fueron probados para determinar su reactividad frente a carbohidratos de la amiba (fig 12).

Se observa que cuando fueron incubados con antígeno no tratado, reconocieron bandas de peso molecular menor de 20 Kd ( carriles 1-14), excepto los carriles 7 y 8 que corresponden al anticuerpo monoclonal 8E4 con especificidad para el sistema nervioso del acocíl y fue utilizado como control negativo. Es tos mismos anticuerpos monoclonales perdiern por completo su reactividad cuando se incubaron con antígenos que fueron trata dos con periyodato 30 mM por 18 horas a temperatura ambiente (carriles 1'-14').

Estos resultados confirman los observados en la técnica de ELISA.

#### 8. RECONOCIMIENTO DE PROTEINAS DE E. histolytica POR ACS MONOCLONALES.

Con el objeto de tener idea de la estructura molecular de los antígenos reconocidos por acs monoclonales, se ensayó la susceptibilidad de éstos anticuerpos a una proteasa y al calor. Era de nuestro interés probar aquellos monoclonales que no per diron por completo su actividad después de tratarlos con peryo dato mediante la técnica de ELISA fig. 6.

A) Se trató extracto total de E. histolytica preparado para electroforesis, con la proteasa (SubtiloepsidasaA). El antígeno así tratado, se colocó directamente en PHC en forma de gota. Los anticuerpos monoclonales ensayados fueron : (A57, A8,C6, F9 D4, 1D10, 2F11, 6G9, 5B6, 1H8, 6H3, D12 y D10). En la figura 13, se muestra la reactividad de éstos anticuerpos cuando los antígenos no fueron tratados con la enzima. Como se puede obse var, los anticuerpos monoclonales reaccionaron con la misma intensidad cuando se expusieron a antígenos no tratados (pozos de la parte superior), en cambio, en los controles se detectó que la reactividad disminuyó cuando los ligandos : suero de ratón Inmune y el ac. monoclonal anti-actina fueron enfrentados a an tígenos tratados con la enzima (ciras 1,3 y 5).

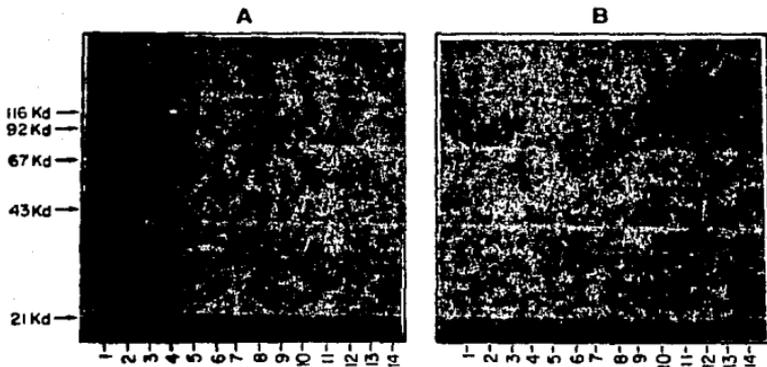


FIGURA 12. RECONOCIMIENTO DE CARBOHIDRATOS DE *E. histolytica* POR ANTICUERPOS MONOCLONALES EN PNC.

La parte B de la figura, se trató con metaperiodato de sodio 30 mM y la parte A se empleó como control. Los carriles indicados con -- los números del 1 al 14 y 1' al 14' se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales:

1 y 1'-A8	6 y 6'-D12	11 y 11'-SB6
2 y 2'-C6	7 y 7'-8E4	12 y 12'-1H8
3 y 3'-F9	8 y 8'-8E4	13 y 13'-6H3
4 y 4'-1D10	9 y 9'-D4	14 y 14'-D10
5 y 5'-6G9	10 y 10'-2F11	

Los anticuerpos monoclonales del 1 al 7 y 1' al 7' provenían de sobrenadantes de cultivo de hibridomas y del 8 al 14 y 8' al 14' se usaron ascitis. El ac. monoclonal 8E4 reconoce el sistema nervioso del acocil y fué usado como control negativo.

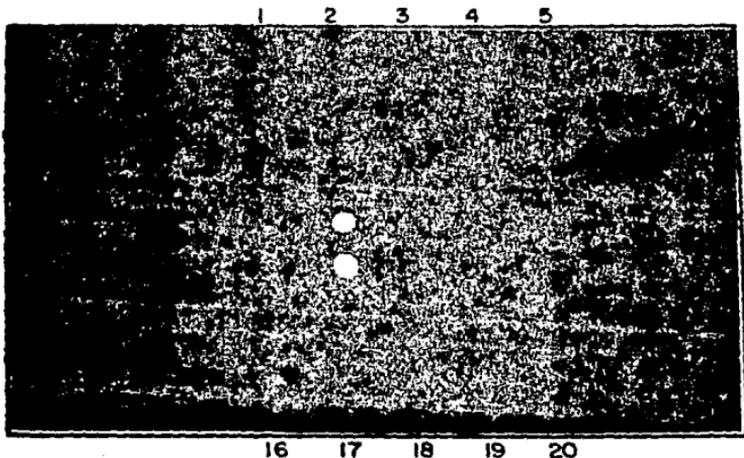


FIGURA 13. RECONOCIMIENTO DE PROTEINAS DE E. histolytica POR ANTICUERPOS MONOCLONALES MEDIANTE INMUNODOTT.

Cada tira contiene dos gotas de antígeno de amiba; La superior es -- tratada con subtilopectidasa A y la inferior no tratado. Como controles se utilizaron en las tiras (1 y 5) suero de ratón inmune contra E. histolytica, (2) suero de ratón normal, (3) ac. monoclonal anti-actina y (4) ac. monoclonal contra el sistema nervioso del acocil -- 8E4. Los anticuerpos monoclonales (anti-amiba) corresponden a las ti ras:

6-A57	11-F9	16-5B6
7-A1 <sup>n</sup> A12	12-D4	17-1H8
8-A35	13-1D10	18-6H3
9-A8	14-2F11	19-D12
10-C6	15-6G9	20-D10

B) En un experimento similar al anterior, se probó la reactividad de los anticuerpos monoclonales ( A8, A57, A35, A14A12 C6, ID10, D12, F9, 2F11, 5B6, 1H8 y 6H3), después de tratar los antígenos con calor durante una hora a 93 C fig 14 (en este caso, los antígenos tratados con calor, se colocaron en la parte inferior de cada tira y los no tratados en la parte superior) Todos los anticuerpos monoclonales ensayados, reaccionaron con la misma intensidad cuando se expusieron a antígenos tratados con calor que con los antígenos no tratados.

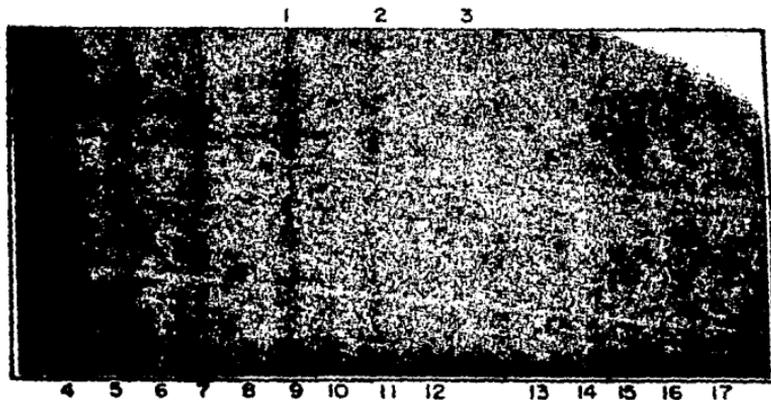


FIGURA 14. REACTIVIDAD DE ACS MONOCLONALES ANTI E.histolytica DESPUES DE TRATAR LOS ANTIGENOS CON CALOR.

Cada tira de PNC contiene antígeno de E.histolytica en gotas. Las superiores son sin tratar y las inferiores calentado a 93°C durante una hora. Los controles están indicados con los números.

- 1.- suero normal de ratón.
  - 2.- suero de ratón inmune contra S.histolytica.
  - 3.- Ac. monoclonal 824 anti sistema nervioso del accoil.
- Los carriles del 4 al 17 corresponden a los acs monoclonales que se ensayaron.

4-A8	8-06	12-F9	16-1H8
5-A57	9-1D10	13-D4	17-6H3
6-A35	10-D10	14-2F11	
7-21A12	11-D12	15-5E6	

## VI. DISCUSION

Dado un punto de vista inmunológico, los antígenos de la membrana celular de *E. histolytica*, son las principales moléculas que pueden tener relación con la acción efectora del sistema inmune.

En un trabajo previo, Calderón, 1986, (11) se demostró por inmunofluorescencia que los 15 anticuerpos monoclonales estudiados en el presente trabajo reconocen estructuras que se encuentran en la superficie de la amiba, pero no se realizó la caracterización química de dichas moléculas.

Nosotros iniciamos la caracterización química de las moléculas reconocidas por éstos anticuerpos monoclonales, haciendo el análisis para carbohidratos como primera posibilidad debido a que se ha planteado que las funciones de reconocimiento y adhesividad a las células blanco es a través de moléculas del tipo de glicconjugados presentes en la amiba. (5) (12) (36) (54).

Cabe mencionar que los anticuerpos monoclonales estudiados, reconocen bandas de bajo peso molecular ( 20 k<sub>d</sub> ) mediante electrotransferencia. Excepto el monoclonal A57 que reconoce dos bandas polipeptídicas de (60 y 20 k<sub>d</sub>), y los anticuerpos monoclonales (A35 y A14A12) cuyo peso molecular no se ha determinado.

Con el objeto de conocer la consistencia de nuestros resultados, el análisis para carbohidratos con los anticuerpos monoclonales lo efectuamos por dos métodos. ELISA E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Del análisis para carbohidratos mediante ELISA con los 15 anticuerpos monoclonales, definimos que 13 de ellos reconocen carbohidratos debido a que perdieron su reactividad después de tratarlos con peryodato no observándose en ninguna de las diluciones empleadas (1 a 1/256) en cambio, los anticuerpos monoclonales A14A12 y A57 solo disminuyeron su título de 1/256 a 1/16, esto solo se observó en ELISA ya que en transferencia el A14A12 y el A35 no reconocen antígenos desnaturalizados y el A57 no se probó por este método.

Por electrotransferencia, se ensayaron 12 anticuerpos monoclonales cuya especificidad es por antígenos de E.histolytica de bajo peso molecular.

Las bandas de reconocimiento que presentan, desaparecieron cuando los antígenos fueron tratados con peryodato, lo cual significa que los anticuerpos monoclonales reconocen carbohidratos. Este análisis confirma los resultados encontrados por ELISA.

Utilizando diferentes concentraciones de peryodato, determinamos que con una concentración de 50 mM de  $\text{NaIO}_4$  a 4 C durante 24 horas los carbohidratos se oxidaron. Esto lo demostramos oxidando con peryodato ovoalbúmina así como antígeno de amiba, observando su pérdida de reactividad con Concanavalina A.

Estos resultados sugieren la total oxidación de los carbohidratos de E.histolytica en ELISA, ya que se ha encontrado que todas las moléculas de la superficie de la amiba, son reconocidas por Con A (12). Además se sabe que el 89% de los carbohidratos obtenidos de una molécula encontrada en amiba, son: glucosa, galactosa y xilosa principalmente. (33) y la Con A usada para detectar carbohidratos tiene especificidad por los siguientes: D-glucopiranososa, D-manopiranososa, D-fructofuranosa, sus glucósidos y estru-turas estéricamente relacionadas. (8) (27) y (50).

Las condiciones del tratamiento con peryodato para carbohidratos en papel de nitrocelulosa fueron diferentes a las que establecimos en ELISA: 30 mM de  $\text{NaIO}_4$  durante 18 horas a temperatura ambiente. Para asegurar que durante la oxidación, las proteínas de la amiba no sufrieran modificaciones que alteraran su antigenicidad, utilizamos en ambos métodos controles: En ELISA empleamos a la albúmina sérica de Bovino (BSA) y en inmunoelectrotransferencia a la proteína (ACTINA) una de las proteínas muy conservadas en todas las células eucarióticas y que se encuentra en E.histolytica (60).

El anticuerpo monoclonal anti-actina de cerebro de rata, también reconoció la actina de amiba, de tal forma que se observó una banda de reconocimiento correspondiente al peso molecular de la actina.

Tanto la actina de la amiba, como la BSA, no alteraron su reactividad después de tratarlas con peróxido en las mismas condiciones en que se efectuó el análisis con los anticuerpos monoclonales.

Los resultados de éstos controles nos indican que la pérdida de la reactividad de los anticuerpos monoclonales se debe a la modificación de los carbohidratos y no a las proteínas de la amiba.

El análisis inmunoquímico para la determinación de la naturaleza peptídica de los epítopes con la batería de los 15 anticuerpos monoclonales fue evaluada con la enzima Subtilopeptidasa A, proteasa que ejerce su efecto sobre los sitios activos de los residuos de serina, (55), y por su tratamiento con calor. Ambos ensayos se efectuaron por el método de Inmunodot.

El anticuerpo monoclonal anti-actina de cerebro de rata ( que también reconoce la actina de la amiba ) disminuyó su reactividad después de que se trató con Subtilopeptidasa.

Lo mismo sucedió con el anticuerpo policlonal contra amiba . Estos resultados indican la actividad de la proteasa sobre las proteínas de la amiba, permitiendo de ésta manera evaluar la susceptibilidad de los epítopes de E. histolytica que reaccionan con los anticuerpos monoclonales . Ninguno de los 15 anticuerpos monoclonales analizados modificó su actividad después del tratamiento con la enzima.

Por otro lado, demostramos que antígenos de E. histolytica tratados durante una hora a una temperatura de 93 C, fueron reconocidos por los anticuerpos monoclonales con la misma intensidad que los antígenos no tratados. Estos ensayos sugieren que los epítopes que reconocen no son de naturaleza proteínica.

En conclusión, en éste trabajo determinamos que los epítopes de E. histolytica detectados con los 15 anticuerpos monoclonales fueron, estables al calor durante una hora a 93 C, resistentes a la enzima subtilopepti-

dada y 13 de ellos reconocibles al metaperóxido de sodio, por lo que pensamos que se trata de carbohidratos, como parte integral del epítipo.

Se ha reportado que los anticuerpos dirigidos en contra de determinantes antigénicos carbohidratos, pueden reaccionar cruzadamente con compuestos que llevan el mismo residuo terminal de azúcar no reductor prescindiendo de otras diferencias estructurales (35).

Tal es el caso de los anticuerpos hacia el polisacárido del neumococo tipo XIV que reacciona con los residuos ( galactosil ) de otros polisacáridos, glucoproteínas o glucolípidos. (29) (3) (64).

En contraste con lo que se esperaría del análisis de reactividad cruzada de E.hintolytica con otras especies de Entamoeba, solo el anticuerpo monoclonal (A35) presentó reactividad cruzada por antígenos de E.laredo, E.moshkovskii y E.invadens. Todos los demás anticuerpos monoclonales son especie-específicos. No se realizó el análisis de los epítipos para la determinación de los lípidos.

Sobre la naturaleza lipídica de antígenos, hay poca información, sólo se sabe a que sus propiedades tales como la insolubilidad en agua y el enmascaramiento de determinantes antigénicos por la formación de agregados, dificulta el empleo de técnicas estándares para su estudio. Por ésta razón, los estudios sobre la naturaleza química de determinantes antigénicos, se ha enfocado hacia las proteínas y los carbohidratos. Sin embargo, se sabe que los lípidos juegan un papel importante no solo como componentes estructurales en las membranas celulares, sino también en la determinación de sus propiedades inmunológicas (65).

Los carbohidratos como estructuras antigénicas, pueden formar parte de complejos tales como glucoproteínas o glucolípidos.

La naturaleza completa de las moléculas reconocidas por los anticuerpos monoclonales no puede asegurarse con éstos datos. Con nuestros resultados podemos descartar la posibilidad de que se trate de una glucoproteína como parte integral del epítipo para 13 de ellos que son de bajo peso molecular y no reconocen proteínas, por lo que es más probable que sean glucolípidos. Los otros -

dos (A57 y A14A12) parecen reconocer un epítoto formado en parte por un carbohidrato y otra estructura que quizá sea de naturaleza proteica, ya que por ejemplo el A57 reconoce dos bandas de peso molecular mayores que las reconocidas por los 13 restantes y el A14A12 no reconoce antígenos denaturalizados.

Con respecto a su naturaleza estructural, se ha determinado que cuando los epítotos son carbohidratos, son principalmente secuenciales más que conformacionales (25).

De los 15 anticuerpos monoclonales, 13 reconocen únicamente carbohidratos, por lo que podemos inferir que la naturaleza estructural de estos epítotos es secuencial.

Por diferentes métodos se ha tenido evidencia de la existencia de carbohidratos en la superficie de los trofozoitos de E. histolytica, por ejemplo : con Con A, se ha observado aglutinación de los trofozoitos de E. histolytica (47).

Otro trabajo demuestra que todas las proteínas de superficie de la amiba, son glucoproteínas ya que reconocen Con A y son eluidas específicamente con  $\alpha$ -Metil-manósido a través de una columna (2).

Con colorantes como el azul de alciano que se combina con glucoproteínas polisacáridos y algunos tipos de celulosa (71), fue posible observar la presencia de glucoproteínas en la capa exterior del glicocalix de los trofozoitos de E. histolytica (19).

Otros investigadores tratando de definir la naturaleza de los componentes inmunogénicos de E. histolytica, han abordado el estudio, mediante técnicas de separación y purificación de los componentes de la amiba. Tal es el caso de la lipopeptidofosfoglicana, molécula encontrada en la superficie de la amiba, que reacciona fuertemente con suero de pacientes con absceso hepático amibiano (32).

Recientemente al tratar de purificar la porción polisacárida de esta molécula, se demostró que tanto los lípidos como los carbohidratos participan en la antigenicidad de la amita (33).

Por diferentes métodos de extracción, otros autores reportaron la presencia de un lípido altamente inmunogénico (swinoglucofosfolípido) que presenta reactividad cruzada con la lipopéptidofosfoglicana (21).

Consideramos que los anticuerpos monoclonales con una herramienta muy valiosa para caracterizar químicamente moléculas.

En el campo de la parasitología, la caracterización química de moléculas ha hecho posible la clasificación serológica de varios microorganismos (66) (41).

La importancia de este trabajo radica en haber determinado que los anticuerpos monoclonales reconocen carbohidratos de la superficie de la amita. Esto será de gran utilidad, ya que abre las posibilidades para estudiar algunas funciones biológicas como son el reconocimiento y la adhesividad a las células blanco.

Por otro lado, la metodología aquí desarrollada será valiosa no solo para caracterizar la naturaleza química de una molécula, sino también puede ser aplicada en la producción de anticuerpos monoclonales en la etapa de selección de híbridos, de tal manera que se puedan producir anticuerpos monoclonales específicos de moléculas con la naturaleza química de interés.

## VII. CONCLUSIONES.

1.- Se establecieron las condiciones para oxidar carbohidratos con metaperyodato de sodio, en las cuales a) glucoproteínas de la amiba y ovoalbúmina pierden su reactividad con Concanavalina A; b) albúmina sérica bovina y actina de amiba, ambas carentes de carbohidratos, no pierden antigenicidad con sus respectivos anticuerpos.

2.- De los 15 anticuerpos probados, 13 reconocen como epítoto carbohidratos de la superficie de la amiba ya que, tanto por ELISA como por transferencia, pierden su reactividad con antígenos tratados con metaperyodato de sodio.

3.- Los tratamientos con calor y subtilisina A, a los cuales los antígenos reconocidos por los 15 anticuerpos monoclonales fueron resistentes, sugieren que los epítotos no son proteínas.

4.- Dos de los anticuerpos monoclonales (A57 y A14A12) solo pierden parcialmente su reactividad con antígenos oxidados con metaperyodato de sodio, sugiriendo que el epítoto está formado por carbohidratos y alguna otra estructura proteínica o lipídica..

VIII. REFERENCIAS.

1. Abe, H.F., Hinagawa, Y., Yoshimoto, T., Ozawa, K., Saikawa y Wato, T. (1980). Fluorescent latex antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with Mycobacterium leprae. Int. J. Lepr. 48, 139.
2. Aley, P.Z., Scott, H.A., Cohn, Z.A. (1980). Plasma membrane of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152, 391.
3. Allon, P.E. y Kabat, E.A. (1959). J. Immunol. 82, 358.
4. Arroyo-Pegovich, A., Carabez-Troje, A. y Ruiz, H.J. (1972). Composición de la pared celular de quistes de E. invadens. Arch. Invest. Méd. 3, suppl 2, 265.
5. Arroyo, R., Orozco, E. (1986). Localización e identificación de adhesina I. Una proteína que participa en la adhesión de Entamoeba histolytica a eritrocitos humanos y células epiteliales. Arch. Invest. Méd. 17. suppl 1, 135.
6. Avila, E.E., Sanchez-García, M y Calderón, J. (1985). Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens sulfhydryl-dependent proteolytic activity. J. Protozool. 32, 163.
7. Barker, D.C., Swales, L.S. (1972). Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoites to cyst in axenic Entamoeba sp. Cell. Differ. 1, 297.
8. Bernhard, W. y Avramous, S. (1970). Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A. Exp. Cell Res. 64, 232.
9. Britton, W. J., Hallowist, L., Easton, A., Rainon, R. L. (1975). Mycobacterium leprae antigens involved in human immune responses. The Journal of Immunology. The American Association of Immunologist. 135, 4171.
10. Burnet, F. M. (1957). A modification of Jerne's Theory of antibody production using the concept of clonal selection. Austral J. Sci. 20, 67.
11. Calderón, E. S. (1986). Tesis de Maestría. Departamento de Biología Celular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
12. Cano-Mancera, R. (1985). Tesis de Doctorado, Departamento de Biología Celular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

13. Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, H.N. y col. Microbiology 2nd. edition. Harper & Row. New York, USA. 632
14. Duamond, L.S., Harlow, D.R. y 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
15. Dubois, D.B. y Rosen, P.E. (1983) Use of human antibodies to identify antigens in cultured human tumor cell: detection of discrete antigen molecules using electroblotting and enzyme-linked antibody probes. J. Immunol. Meth. 63, 7
16. Edelman, G.M. y Paulik, M.D. (1961) Studies on structural unites of the globulin. J. Exp. Med. 113, 681
17. Edelman, G.M. (1973) antibody structure and molecular immunology. Science. 180, 830.
18. Elmer R.N. y Glenn, A.N. (1976) Parasitology (the biology of animal parasite). 4nd. edition, Lea 7 Febiger, Philadelphia Copyright.
19. Fera-Velasco, A., Treviño-García, M.N., Ruiz, J. (1972) Mucopolisacáridos en el glicocálix de E. histolytica. Estudio citoquímico de alta resolución. Arch. Invest. Méd. 3, suppl 2 304
20. Freachem, R.G., Braddeloy, D.J. Garelick, H. y Mara, D. (1963) Sanitation and disease. Health aspects of excreta and wastewater management. Chichester: Wiley/world Bank. 337
21. Gitler, C., Calef, E. y Rosenberg, I. (1984) Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica and the host tissues. Trans. R. Soc Lond. 3079
22. Gittler, C. mogyros, M., Calef, E. y Rosevberg, I. (1985) Lethal recognition between Entamoeba histolytica and the host tissues. Trans. R. Soc. Trop. Med. 79, 581
23. Goebel, W.F., Ph.D., y Perlmann, G.E. (1949) The effect of lithium periodate on cristalline bovine serum albumin. J. Exp. Med. 49, 479.
24. González-Angulo, A., Treviño, N., Zavala, B.J. y Yabor, E. (1965) Morfología de los trofozoítos de E. histolytica. Estudios con Microscopía Electrónica. Bol. Estud. Med. Biol. 23, 169
25. Goodman, J.W. Antigenic determinants and antibody combining sites En the antigens III: 127 (1975) (Sela, M., ed). Academic Press, New York.

26. Guerrant, R.L., Brush, J., Rawdin, J.I., Sullivan, J.A. y Mandell G.L. (1981) Interaction between Entamoeba histolytica and human polymorphonuclear neutrophils. *J. Inf. Dis.* 43, 83
27. Halina, L. y Nathan, S. (1973) The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins) *Annu. Rev. Biochem.* 42, 541
28. Hancock, K. y Tsang, V.C.W. (1983) India Ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Analytical Biochemistry.* 133, 157
29. Heidelberger (1956) Lectures in immunochemistry. Academic Press. New York.
30. Honigherg, M., Balamuth, W., Bovee, E.C., Corliss, J.O., Gajdies M., Hall, R.P., Levine, N.D., Loeblich, A.R., Weoser, J. Kudo, R.P. y Wenrich, D.H. (1964) A revised clasification of the phylum protozoa. *J. Protozool.* 11, 7
31. Howard, L.V. (1975) Neutralization of Chlamydia trachomatis in cell culture. *Infected Immun.* 11, 698
32. Isibasi, A., Santa-cruz, M., Soto, X., Ramirez, A., Kumate, J., (1982) Localización en los trofozoitos de Entamoeba histolytica de una lipopéptidofosfoglicana extraída por el método de fenol-agua de la cepa HK-9. *Arch. Inves. Méd.* 13 suppl 3, 157
33. Isibasi, A., Santa-cruz, M., Cottlieb, M. Kumate, J. (1986) Purificación de la porción polisacárida de la lipopéptidofosfoglicana extraída de los trofozoitos de Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Méd.* 17, suppl I, 73
34. Jarumilinta, R., Kradofer, F. (1964) The toxic effect of Entamoeba histolytica on leucocytes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 58, 375.
35. Kabat, E.A., y Meyer, M. (1961) *En Experimental Immunochemistry* Holt, New York. 19
36. Kobiler, D. y Mirelman, D. (1980) Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. *Infect. Immun.* 29, 221
37. Kohler, G. y Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495
38. Kohler, M. Howe, S.C. y Milstein, C. (1976a) Fusion between immunoglobulin-secreting and non-secreting myeloma cell lines *Eur. J. Immunol.* 6, 292.

39. Kohler, G. y Milstein, C. (1976b) Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immun. 6, 511
40. Kohler, G. (1984) Derivation and Diversification of monoclonal antibodies. Novel Lecture. Bioscience Reports 5, 533
41. Kronvall, G., Standard, J.L. y Walsh, G.P. (1976) Studies of mycobacterial antigens with special reference to Mycobacterium leprae. Infect. Immun. 13, 1132
42. Laemmli, U.K. (1979) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T, A. Nature. 227, 680
43. Levy, R., Dilley, J., Fox, R.J., Warnke, R.A. (1979) Human thymus leukemia. Antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 8552
44. Lowry, O.H., Rosenbroug, N.J., Lewis, F.A., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265
45. Macgrath, B.G. (1963) Pathogenesis and pathogenic mechanisms in protozoos diseases with reference to amoebiasis and malaria. En immunity to protozoos. Garnhamy, P.C., Pierce, A.G. Roitt, J. Edds). Philadelphia, F.A., Davis, Co. 48
46. Markwell, M.A.K., Fox, F. (1978) Surface specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cell using 1,3,4,6-tetracloro,3,6-diphenil glucoril. Biochemistry 7, 4807
47. Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., De la Torre, M. (1973) Selective aglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica indexed by Concanavalin A. Nature. New Biol. 245, 186
48. Martínez-Palomo, A. (1982) The biology of Entamoeba histolytica Reserch. Studies. Press. Ed. John wiley y Sons L.T.D., Letchworth, Inglaterra.
49. Martínez-Palomo, A. (1986) Clinics in Tropical Medicine and comunicable Diseases. 1, 3
50. Miercio, E.A. Pereira y Elvin, A. (1979) Immunochemical studies on lectins on their applications to the fractionation of bloots group substances and cells. CRC. Clinical Reviews in Immunology. 33

51. Ofek, I., Mirelman, D., Sharon, N., (1977) Adherence of Escherichia coli to human mucosal cell mediated by mannose receptors. *Nature* 265, 623
52. Orozco, E., Martínez-Palomo, A., Guarneros, G. (1980) Virulencia y propiedades de la superficie de varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Méd.* 11, suppl 1 153
53. Orozco, E. Martínez-Palomo, A., González R.A., Guarneros, G. y Mara, J. (1982) Interacciones lectina-receptor median la adherencia de E. histolytica a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. *Arch. Invest. Méd.* 13, 159
54. Orozco, E., Suárez-M.E., Martínez-Palomo, A., Cuarneros, G., Kobiler, D., Mirelman, D. (1982) Receptores participantes en la adherencia de E. histolytica a eritrocitos humanos. *Arch. Invest. Méd.* 13, suppl 3-177
55. Ottesen, M.S., Perlman, G.E., y Lorand, L. (1970) The subtilisins. In *Enzymology. Proteolytic Enzymes*. Academic Press. New York and London 19, 199
56. Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L. (1981) Role of adherence in the cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Study with mammalian tissue culture cells and human eritrocites. *J. Clin. Invest.* 68, 1305
57. Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L. (1980). Studies on the cytopathogenicity of entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Méd.* 11, suppl 1 123
58. Richard, S., Stephens, M.R., Tam, Cho-chouk-W., y Robert C.N. (1982). Monoclonal antibodies to Chlamydia trachomatis. Antibody specificities and antigen characterization. *J. of Immunology* 128. 3, 1083
59. Reivherz E.L., Kung A.C., Goldstein G. Schlossman S.F. (1979) Separation of functional subsets of human T cells by monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4061
60. Sabanero, M y Meza, I. (1982) Localización de actina en trofozoítos de Entamoeba histolytica (HMI). *Arch. Invest. Méd.* 13 suppl 3, 37
61. Said-Fernández, S., Vargas-Villareal, J. y Castro-Garza, J. (1986) Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de Entamoeba histolytica. *Arch. Invest. Méd.* 17, 173

62. Said-Fernández, S. y López-Revilla, R. (1988) Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of Entamoeba histolytica trophozoites. *Infection and Immunity*. 874
63. Shier, W.F. (1979) Activation of high levels of endogenous phospholipase A<sub>2</sub> in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76, 295.
64. Siddiqui y Hakomori (1973). *Biochem Biophys. Acta*. 330, 147
65. Smolarsky, M. (1980) A simple radioimmunoassay to determine binding of antibodies to lipid antigens. *J. of Immunological Methods*, 38, 85
66. Stephens, R.S., Tam, M.R., Kwo-C-C y Nowinski, R.C. (1982). Monoclonal antibodies to Chlamydia. Antibody specificities and antigen characterization. *The American Association of Immunologists*. 128, 3, 1083
67. Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, I. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350
68. Vargas-Villareal, J., Said-Fernández, S. (1984) Caracterización de la actividad fosfolipásica de E. histolytica. XV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica (resúmenes) 231
69. Walsh, I. (1986b) Amebiasis in the world. *Arch. Invest. Méd.* (in press)
70. Young, I.D.E., Young, T.M., L.V.? L.P. y col. (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from E. histolytica. *J. Exp. Med.* 56, 1677.
71. Zugibe, F.T. (1970) *Diagnostic Histochemistry*, S.T. Lovis. The C.V. Mosby Company.