



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

I Z T A C A L A

**INMUNODETECCION DE LOS GRANULOS DE SECRECION
EN EL PARASITO Entamoeba histolytica**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

VERONICA IVONNE HERNANDEZ RAMIREZ



MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fué realizado, bajo la asesoría de la Doctora María de Lourdes Muñoz Moreno, en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. El desarrollo de esta tesis fué apoyado, mediante una beca otorgada por el CONACYT (No. de registro 58970), y los donativos de: CONACYT (PCSACNA-050567), COSNET, SEP (441.85 y F.E.I.) y Ricardo J. Zebada 83/87. La Microscopía fué realizada en la Unidad de Microscopía Electrónica de esta Institución.

AGRADECIMIENTOS

DE MANERA MUY ESPECIAL AGRADEZCO A LA DRA. M.L. MUÑOZ MORENO POR SU PACIENCIA Y DEDICACION QUE TUVO PARA LA DIRECCION DE ESTA TESIS, ASI COMO SU ACCESIBILIDAD COMO PERSONA.

A LA Q.F.B. ROSALINDA TOVAR GALLEGOS POR LA REALIZACION EXCELENTE DE TODO EL MATERIAL FOTOGRAFICO QUE SE EMPLEO EN ESTE TRABAJO Y POR SU ORIENTACION DESDE MI INGRESO AL LABORATORIO.

A LA Q.F. MARGARITA DE LA TORRE POR PROPORCIONARME EL MATERIAL BIOLOGICO QUE EMPLEE DURANTE LA REALIZACION DE ESTA TESIS.

A MIS COMPANEROS DE LABORATORIO:
BIOL. GLORIA LEON, BIOL. JAVIER PEREZ Y AL P. BIOL. MIGUEL MORENO POR SU AMISTAD Y DISPONIBILIDAD EN TODO MOMENTO.

A MARCO ANTONIO, QUIEN HA SIDO PARA MI MUY IMPORTANTE DURANTE ESTE TIEMPO Y A QUIEN QUIERO MUCHO.

DEDICATORIAS

ESTE TRABAJO DE TESIS ESTA DEDICADO A LA MEMORIA DE MI TIO
JESUS GUTIERREZ MARTINEZ, QUIEN SE HUBIERA ALEGRADO
SINCERAMENTE DEL LOGRO DE ESTA META.

RECORDANDOTE SIEMPRE: TU SOBRINA QUE TE QUIERE.

A MI PADRE MIGUEL HERNANDEZ RAMIREZ POR EL APOYO Y CONFIANZA
QUE SIEMPRE ME HA OFRECIDO.

A MI MADRE GLORIA RAMIREZ DE HERNANDEZ POR EL AMOR Y
COMPRESION QUE SIEMPRE ME HA DADO.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	11
I.-RESUMEN.....	111
II.-INTRODUCCION.....	1
a)Patología de la amibiasis humana.....	3
b)Biología del parásito.....	6
c)Diferenciación de cepas patógenas y no patógenas..	10
III.-ANTECEDENTES.....	12
IV.-SECRECION EN CELULAS EUCARIOTAS SUPERIORES.....	15
V.-OBJETIVOS.....	17
VI.-METODOS	
a)Cultivo de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	18
b)Extracción de colágena tipo I de placenta humana...18	
c)Cinética de secreción.....	19
d)Preparación de antígeno amibiano.....	20
e)Obtención de anticuerpos anti-gránulos.....	20
f)Presipitación de Inmunoglobulinas.....	21
g)Inmunoquímica e Inmunocitoquímica.....	21
h)Electroforesis.....	31
i)Inmunotransferencia.....	33
VII.-RESULTADOS	
a)Localización de cromatina condensada en núcleos de trofozoítos activados para la secreción.....	37
b)Detección de los componentes de los GED por el método de ELISA.....	40
c)Localización de los componentes de los GED por inmunofluorescencia indirecta.....	42
d)Reconocimiento de proteínas de los GED por el anticuerpo IgG anti GED.....	49
VIII.-DISCUSION.....	56
IX.-CONCLUSIONES.....	64
X.-BIBLIOGRAFIA.....	65

ABREVIATURAS

MET	MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION
GED	GRANULOS ELECTRODENSOS
IgG	INMUNOGLOBULINAS DE ISOTIPO G
SDS	DODECIL SULFATO DE SODIO
OPD	ORTO FENIL DIAMINA
DAB	DIAMINOBENCIDINA
h	HORAS
FITC	ISOTIOSIANATO DE FLUORESCINA
PO	PEROXIDASA
kDa	KILODALTONES
Mr	MOVIMIENTO RELATIVO
pI	PUNTO ISOELECTRICO
ELISA	ENSAYO INMUNOABSORBENTE CON ANTICUERPO UNIDO A UNA ENZIMA
rpm	REVOLUCIONES POR MINUTO
PBS	AMORTIGUADOR DE FOSTATOS SALINOS
PBS-A	AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINOS PARA AMIBAS
e ⁻	ELECTRONES
TEMED	N,N,N',N'-TETRAMETILETILENDIAINO
TRIS	TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO
D.O.	DENSIDAD OPTICA

LISTA DE FIGURAS

- 1) Sistema de inmunodetección empleando el método de la proteína A-biotinilada y avidina marcada.
- 2) Localización de cromatina en trofozoítos activados por 3 horas.
- 3) Localización de cromatina en trofozoítos activados por 6 horas.
- 4) Localización de cromatina en trofozoítos activados por 15 horas.
- 5) Detección de los componentes de los GED por el método de ELISA.
- 6) Inmunolocalización de los componentes de los GED en trofozoítos con KCl.
- 7) Gel de colágena incubada con anticuerpo anti GED.
- 8) Inmunodetección de los GED en trofozoítos sin activar.
- 9) Inmunodetección de los GED en trofozoítos activados por 3 horas de incubación con colágena tipo I.
- 10) Inmunolocalización de los componentes de los GED en trofozoítos activados por 6 horas.
- 11) Inmunodetección de GED en colágena adherida a trofozoítos activados para la secreción.
- 12) Inmunolocalización de los GED en trofozoítos activados por 15 horas de incubación con colágena tipo I.
- 13) Reconocimiento de proteínas de los GED por el anticuerpo IgG anti GED.
- 14) Especificidad de las IgG anti GED en colágena transferida.
- 15 (A) Modelo de trofozoítos de Entamoeba histolytica normales.
- 15 (B) Modelo hipotético del proceso de secreción de trofozoítos de Entamoeba histolytica.
- 16) Modelo de la División nuclear.

RESUMEN

Estudios "in vitro" empleando células de ovario de hámster han establecido los siguientes eventos secuenciales durante el proceso de patogenicidad de Entamoeba histolytica: adhesión a la célula blanco, secreción extracelular de enzimas y por último la fagocitosis. Así mismo actualmente se ha detectado una actividad de colagenasa localizada en los gránulos de secreción del parásito, cuando éste es activado con colágena tipo I. Por lo tanto, la aparición de estos gránulos podría estar involucrado en el proceso invasor de este parásito hacia los tejidos del hospedero. Consecuentemente, resulta de interés estudiar la secuencia de las diferentes etapas de activación durante el proceso de secreción en este protozoario.

Se emplearon ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) con el sistema de proteína A-biotinilada y estreptoavidina-peroxidasa. Así mismo, se prepararon anticuerpos policlonales de borrego anti-gránulos y se probaron en antígeno amibiano normal y activado por 3,6 y 15 h con colágena tipo I. Observándose que el reconocimiento de los anticuerpos va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de incubación con la colágena. Por inmunofluorescencia indirecta empleando el sistema de proteína A-biotinilada y avidina-fluoresceinada se observó que en trofozoitos no activados la fluorescencia se distribuye en la membrana

plasmática, citoplasma y en el núcleo. Después de activar a las células por 3 h, la fluorescencia se localizó muy tenuemente en la membrana plasmática y en forma granular en el citoplasma. A las 6 h se apreció la fluorescencia ampliamente distribuida en el citoplasma en gránulos muy pequeños. Finalmente, a las 15 h se detectaron los componentes de los gránulos perfectamente localizados en la membrana plasmática y de manera muy difusa en el citoplasma. También se observó una disminución de las células marcadas por fluorescencia en este ensayo. En paralelo se observó un reconocimiento de la cromatina condensada en células marcadas únicamente con avidina-fluoresceinada, observándose una distribución heterogénea en los núcleos de los trofozoítos normales. En las células activadas por 3 h se observó en un gran porcentaje de los trofozoítos la fluorescencia en todo el núcleo de manera homogénea. Después de 6 h, la fluorescencia se polarizó en la periferia de la membrana nuclear, finalmente, a las 15 h la cromatina condensada se encontró en forma granular inmersa en todo el nucleoplasma. Resultados de inmunotransferencia de antígenos normales incubados con el anti-gránulos han revelado el reconocimiento de bandas de proteínas que oscilan entre 100 y 143 kDa mientras que en los antígenos activados a las 6 y 15 h se observó la aparición de bandas marcadamente enriquecidas cuyos pesos moleculares principalmente se encuentran entre 100 y 105 kDa.

Estos resultados nos sugieren que los gránulos son secretados al medio extracelular, que este evento es regulado por un estímulo, así mismo, que existe probablemente un proceso de síntesis y/o de maduración de las proteínas de secreción que aparecen de acuerdo al tiempo de activación, por último se sugiere un proceso de sincronización en la organización de la cromatina condensada durante la activación con colágena tipo I para la secreción de los gránulos en este parásito.

11) INTRODUCCION

El proceso evolutivo abarca una serie de cambios continuos en la diversidad y adaptación de las poblaciones de organismos, lo que confiere mayor éxito a una determinada población sujeta a la Selección Natural. De las asociaciones interespecíficas, el parasitismo en su coevolución propicia adaptaciones que son unilateralmente producidas por el parásito, ya que éste se enfrenta a barreras mecánicas o fisicoquímicas presentes en el microhabitat formado por el hospedero (Price, 1980), causándole un impacto negativo. Por tanto se ha establecido esta relación como la capacidad del parásito para vivir en el hospedero, explotando parte o todos los nutrimentos de éste causándole daño (Price, 1980).

De las tendencias evolutivas que surgen en el parasitismo está la especificidad por el hospedero, encontrándose parásitos que han mantenido un amplio espectro hacia el tipo de hospedero y otros, de tan mínimo espectro, que se limitan a uno solo (Halvörsen, 1976). Esta especificidad se establece por adaptaciones estrechamente ligadas al medio bioquímico y fisiológico del hospedero, asegurando la sobrevivencia del parásito ya sea por el desarrollo de un grado de virulencia; como factor de especialización, o un ciclo reproductivo complejo (Price, 1977). De acuerdo a la complejidad del ciclo de vida del parásito se determina el número de hospederos que puede

infectar, encontrando que existen parásitos que pueden alojarse en más de un hospedero, según el estado infectivo del ciclo de vida del parásito.

La parasitología en los últimos años ha tomado gran importancia debido a la existencia de una gran cantidad de estos organismos y a los estragos que provocan en el hombre o en los animales. Los estudios al respecto abarcan aspectos celulares, moleculares, bioquímicos y genéticos.

Dentro de estos parásitos se encuentra el protozooario Entamoeba histolytica que es responsable de la amibiasis y tiene como único reservorio y fuente de infección al hombre. Sin embargo, se ha reportado que primates en cautiverio presentan síntomas clínicos de la enfermedad (Loomis y cols., 1983). Esta enfermedad es ampliamente distribuida en todo el mundo, siendo más frecuente en los trópicos por existir en forma endémica. Su distribución se encuentra principalmente localizada en zonas pobres y en unidades carentes de servicios médicos; como son instituciones mentales de salud y orfanatos. La amibiasis es un problema social y de salud en ciertas áreas de Africa, Asia y América Latina. (Martínez-Palomo y Martínez-Baez, 1981).

La amibiasis se ha asociado aproximadamente a unos 500 millones de infecciones anuales en la población mundial (Walsh, 1979).

En los últimos años la situación se muestra más agravante en las poblaciones rurales y en áreas urbanas

formadas por emigrantes, ya que esta gente se encuentra en constante interacción con focos de contaminación, lo cual facilita la dispersión de este parásito entre sus habitantes (Martínez-Palomo y Martínez-Baez, 1983).

a) PATOLOGIA DE LA AMIBIASIS HUMANA

E. histolytica es el agente causal de la amibiasis y se sabe que ésta vive como comensal en el intestino, lo cual se conoce como "amibiasis de lumen", sin embargo esta amiba puede invadir la mucosa intestinal produciendo disentería o amebomas y lesiones extraintestinales, conocidas como "amibiasis invasora". Se ha estimado que aproximadamente un 10% de la población mundial alberga a este parásito (Rough, 1969). Sin embargo, la inherente subjetividad de los exámenes de muestras fecales limitan en gran parte este valor. Reportes clínicos realizados en hospitales generales, han concluido que la amibiasis invasora afecta a todo el suroeste de Asia, el sur y suroeste de Africa y la parte oeste y sur de América (Eldson-Dew, 1971). En México se detectó esta enfermedad desde el 1.6% al 2.1% de todos los pacientes admitidos en hospitales Generales (Alvarez-Alva y Saldívar, 1971). Así mismo se ha establecido que esta enfermedad ocupa los primeros lugares por causa de muerte (Pérez-Tamayo y Brandt, 1971). En nuestro país, una serie de estudios serológicos revelaron que esta enfermedad es de carácter endémico (Gutiérrez y cols., 1976).

Los síntomas de la amibiasis pueden aparecer una o dos semanas después de la infección. La intensidad y naturaleza de las manifestaciones son variables ya que frecuentemente la diarrea no es severa y los síntomas generales son relativamente insignificantes. El desarrollo de la infección es gradual, presentándose dolores abdominales, cólicos, fiebre y las heces contienen sangre y moco, denominándose a este cuadro clínico como disentería (Juniper, 1978).

La infección amibiana en el intestino humano comprende desde la colonización luminal hasta la invasión de la mucosa. No obstante la mucosa colonica puede ser aparentemente normal presentando cambios no específicos; en este caso al hospedero clínicamente se le denomina como "portador asintomático de quistes" (Nanda, 1979). Cuando se presentan complicaciones en la mucosa intestinal se provoca la formación de ulceraciones. En la etapa crítica de esta enfermedad las úlceras se hacen confluentes, desarrollándose con mayor frecuencia en el ciego y colon ascendente (Adams y Mac Lead, 1977). En el colon transversal es relativamente menor ya que solamente se detectan estas ulceraciones en un 10% de los casos. No obstante en un 70% de pacientes con colitis amibiana se han encontrado ulceraciones en áreas segmentales del colon, aunque en un 35% se han reportado en el colon entero (Castro, 1974). La progresión de las ulceraciones provoca perforaciones intestinales, lo cual principalmente ocurre en

el ciego (Jimenez, 1981), aunque éstas pueden originarse en cualquier área del colon; posteriormente puede sobrevenir la peritonitis, así como la formación de una comunicación fistular con la piel, pudiendo también aparecer espacios retroperitoneales, en cavidades viscerales o en el tórax. En un estado crítico de la enfermedad puede ocurrir la necrosis de todo el megacolon, denominándose clínicamente como " megacolon tóxico " (Luvano y cols., 1982). Por tanto, las ulceraciones de la mucosa colonica son distintivas de la infección amibiana invasora, detectándose a través de la colitis aguda y por medio de la disentería (Harder y Rosal, 1975).

La infección intestinal puede complicarse con la diseminación de los trofozoítos amibianos al hígado. Los mecanismos de diseminación que utiliza la amiba para alojarse en el hígado son por la ruta hematógena o por extensión directa. La afluencia de la amiba a este órgano es generalmente por la ruta hematógena, es decir por el sistema vena porta a través de las venulas y radicales portales (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970; Tsutsumi y cols., 1984). En el humano el lóbulo derecho del hígado es más grande que el izquierdo, y se ha reportado que éste presenta mayor incidencia de abscesos con respecto al lóbulo izquierdo. Basándose en la anatomía del flujo sanguíneo portal, se ha explicado que la vena mesentérica inferior drena el colon, favoreciendo automáticamente la perfusión del lóbulo derecho (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970). La

diseminación por extensión directa ocurre por perforaciones intestinales o de la piel perianal. En casos muy agudos se pueden presentar abscesos múltiples en el hígado (Katzenstein, 1982). Los estudios realizados en México por Brandt y Pérez-Tamayo, reportan que los abscesos múltiples ocupan un 85% (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970; Pérez-Tamayo y Brandt, 1971). El absceso hepático está compuesto por una pared capsular, localizando exclusivamente amibas en la periferia de la cápsula.

Al parecer los trofozoítos lisan neutrófilos y la liberación del contenido granulocítico de las células lisadas (Tsutsumi y cols., 1984; Salata y Ravdin 1985b) propician la lisis de hepatocitos distantes de la amiba.

Modelos experimentales de inducción de abscesos hepáticos, han demostrado que a medida que los trofozoítos y neutrófilos son lisados, la amiba permanece inmersa en debris de material basofílico. La progresión del absceso, provoca la formación de una cápsula organizada con fibras reticulares de colágena y fibroblastos rodeados por macrófagos y células epiteliales (Tsutsumi y cols., 1984).

Se ha observado que en un 10% de pacientes con complicaciones de absceso hepático se puede provocar una diseminación de los trofozoítos hacia la cavidad torácica o abdominal (Adams y Mclead, 1977b), así mismo la presentación de peritonitis ocurre en un 31% de los pacientes con éstas complicaciones (Aikat y cols., 1979) causando la muerte a un 45% de ellos. La extensión directa

del trofozoito desde el absceso hepático hacia el parénquima pulmonar, puede provocar abscesos pulmonares o fistulas hepatobronquiales (Adams y MacLeod, 1977).

La ruptura del absceso hacia el pericardio es rara, sin embargo se reporta en un 3% de los casos analizados (Aikat y cols., 1979). La amibiasis pericardial se asocia particularmente con abscesos del lóbulo izquierdo del hígado y causa un 40% de mortalidad (Kapoor y Shah, 1972).

Las complicaciones torácicas son raras, presentando una incidencia de 0.1% en casos clínicos de amibiasis, siendo causantes de un segundo lugar de mortandad. La invasión de la pleura al pulmón o pericardio ocurren en un 30% de pacientes con complicaciones torácicas (Adeyemo y Aderounmu, 1981). Los abscesos pulmonares se presentan en un 14% de casos tóraxicos y pueden perforar hacia el bronquio.

Durante el proceso invasor del parásito E. histolytica, el cerebro es uno de los órganos menos afectado (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970). No obstante, se registra que aproximadamente un 8% de pacientes con amibiasis invasora presentaron daños severos en este órgano. (Lombardo, 1964). Las lesiones que se presentan en el cerebro son de tipo múltiple en un 75% de los pacientes (Benerjee y cols., 1983), involucrando al hemisferio izquierdo con mayor frecuencia en comparación con el derecho, siguiendo en orden descendente el lóbulo occipital y el meningeo (Lombardo, 1964). Las lesiones pueden tener

dimensiones desde 2mm hasta 5cm, desarrollando abscesos con necrosis central.

b) BIOLOGIA DEL PARASITO

No existen factores que muestren ser decisivos en el establecimiento de lesiones en intestino o en hígado por parte del parásito. Sin embargo se ha considerado una variedad de elementos que involucran directamente al hospedero, como son: la localización geográfica, la raza, el sexo, la edad, el estado nutricional e inmunológico, la dieta, el clima local y los hábitos sexuales (Pérez-Tamayo y Brandt, 1971).

Así mismo, la amibiasis intestinal, está considerada como una enfermedad potencialmente letal e importante en términos de consecuencias sociales y económicas, ya que frecuentemente las infecciones, como las provocadas en hígado, incapacitan temporalmente a hombres adultos durante la edad productiva, puesto que se requiere de varias semanas de hospitalización y de dos a tres meses para una recuperación total.

La biología del parásito E. histolytica incluye tanto la fase minuta o formación del quiste, y la forma grande o amebae eritrofagocítica la cual se detecta en la amibiasis invasora. Los trofozoitos hematófagos encontrados en heces son considerados como una evidencia para determinar la naturaleza invasora de la amiba. El

ciclo de vida completo del parásito incluye cuatro estadios consecutivos; el trofozoito, el prequiste, el quiste y el metaquiste. Donde el trofozoito se multiplica por fisión binaria y enquistado durante el estado comensal. Se han encontrado quistes en muestras fecales de pacientes asintomáticos, éstos son cuerpos redondos o semiovoides de consistencia hialina, con un diámetro de $8\mu\text{m}$ a $20\mu\text{m}$ y una pared rígida compuesta de quitina. Los quistes no se desarrollan en los tejidos, pero son los responsables de la transmisión de la enfermedad. Los trofozoitos poseen un período corto de vida fuera del hospedero, ya que no resisten las presiones ambientales. La transmisión de la enfermedad es principalmente por la ingestión de alimentos o agua contaminada con heces y por contacto de persona a persona, en la cual se puede incluir la fornicación (Marr, 1981).

En este parásito es notable la ausencia de organelos típicos de las células eucarióticas, entre los cuales se pueden mencionar a la mitocondria y al nucleolo (McLaughlin, 1985). Sin embargo estudios de ultraestructura en trofozoitos han mostrado la presencia de organelos similares al retículo endoplasmático (Yee, 1970) y aparato de Golgi (Proctor, 1971). Así mismo se han detectado partículas de ribonucleoproteínas (RNP) en forma elongada y helicoidal en el citoplasma, conocidos como cuerpos cromatoides (Rosenbaum, 1970). La ausencia de microtúbulos en citoplasma también es notable aunque pueden ser

detectados en el núcleo de amibas durante la división de éste (Martínez-Palomo, 1982; Solís-Martínez, 1986). La amiba posee un núcleo con un diámetro de 4µm a 7µm y una membrana nuclear doble rodeada por una serie de gránulos que le dan al núcleo la apariencia de un anillo (Martínez-Palomo, 1982). En estos gránulos se ha observado una reacción Feulgen negativa, así mismo los ensayos de amibas incubadas con uridina titriada han revelado que los gránulos son los que presentan la marca, concluyendo que éstos presentan RNA (Pan y Geiman, 1955; Albach y cols., 1977).

c) DIFERENCIACION DE CEPAS PATOGENAS Y NO PATOGENAS

Existen dos aspectos de la biología del parásito E. histolytica que han sido de interés para la investigación de este organismo: la variabilidad del potencial patogénico y la prevalencia de la amibiasis invasora en ciertas áreas geográficas (Martínez-Palomo y Martínez-Baez, 1983). Se ha postulado la existencia de dos especies de E. histolytica las patógenas y las no-patógenas. En 1982, Martínez-Palomo mostró diferencias en la aglutinación inducida por concaavalina A (Con A), la cual era selectiva de las cepas patogénicas de E. histolytica. Así mismo se han detectado diferencias en los patrones isoenzimáticos de cepas virulentas y no virulentas, mostrando que pacientes con amibiasis invasora presentan dos

bandas que corresponden a la hexocinasa, mientras que los obtenidos por pacientes asintomáticos no las presentan (Moss y Mateews, 1987).

El desarrollo de técnicas inmunológicas ha sido de gran utilidad en la posible diferenciación de cepas patógenas y no patógenas de E. histolytica. Estudios recientes, han demostrado que el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopes del trofozoito pueden ser decisivos en el reconocimiento de ambos tipos de células (Ortiz-Ortiz y cols., 1986; Stracham y cols., 1988).

Es evidente que la incidencia de la amibiasis invasora se presentan con mayor frecuencia en zonas de clima caliente y a la presencia de cepas virulentas de E. histolytica, favoreciendo la invasión progresiva del parásito hacia los tejidos del hospedero (Ortiz-Ortiz y cols., 1986). Así mismo, debido a los estragos que provoca este parásito en nuestro país y a que esta enfermedad es característica del sector más pobre de nuestra sociedad (Martínez-Palomo y Martínez-Baez, 1983) resultan especialmente relevantes los estudios que abarquen los aspectos moleculares y celulares relacionados con los eventos de patogenicidad de éste parásito.

111) ANTECEDENTES

La infección invasora causada por E. histolytica aparentemente es el resultado de los siguientes procesos secuenciales: colonización intestinal, adherencia a la mucosa, disrupción de la barrera intestinal y lisis dependiente del contacto directo a células epiteliales y leucocitos del hospedero (Ravdin, 1986).

Se han empleado modelos "in vitro" para definir el probable mecanismo patógeno del trofozoito de E. histolytica cepa HM-1 de cultivo axénico, utilizando células de mamífero. En estos estudios se caracterizaron primordialmente los siguientes eventos: adherencia, citólisis extracelular y fagocitosis (Ravdin y cols., 1980; Ravdin y Guerrant, 1981). Conjuntamente, se ha reportado que en células de ovario de hámster (CHO), neutrófilos humanos, linfocitos T, monocitos y hepatocitos, la citólisis de estas células muestran el establecimiento de una adherencia del parásito dependiente de Gal-GalNac, la cual es inhibible con lectina (Salata y cols., 1985; Ravdin, 1986; Salata, 1986; Salata, 1987). Por otra parte, se ha sugerido que para la lisis de células adheridas por el parásito se requiere de calcio (Ravdin y cols., 1982) así como de la intervención de microfilamentos (Ravdin y cols., 1986), actividad en membrana de fosfolipasa A₂ (Salata y cols., 1985) y secreción de enzimas proteolíticas (Jarumilinta, 1969).

Se ha sugerido que el parásito podría ser capaz de evadir mecanismos de la respuesta inmune. Pacientes sometidos a tratamientos específicos contra la amibiasis invasora pueden presentar reincidencia a nuevas infecciones (Krupp y cols., 1976; Stamm y cols., 1976). Sin embargo la reincidencia a abscesos hepáticos o de colitis amibiana es muy rara (Sepúlveda y cols., 1982). Evidencias experimentales han mostrado que los trofozoítos amibianos, pueden polarizar inmunoglobulinas dirigidas contra todos los componentes del parásito (estructurales y moleculares) hacia la superficie membranal, para luego liberarlos al medio externo, este proceso se conoce como "capping". (Calderón y Muñoz, 1980). Paralelamente la lisis de leucocitos humanos puede facilitar la penetración de la amiba al tejido, ya que la acción de las enzimas de los leucocitos muertos facilita este proceso (Jarumilinta y Kradolfer, 1964).

Se ha determinado que la participación de la membrana de E. histolytica es decisiva en el proceso invasor de este parásito. Estudios realizados por microscopía electrónica de barrido han demostrado que la asociación con bacterias incrementan el número relativo de especializaciones de superficie en el parásito, así como un elevado polimorfismo en membrana de diferentes cepas patógenas de E. histolytica (González-Robles y Martínez-Palomo, 1983). Por otra parte, se han aislado proteínas formadoras de poros de extractos amibianos llamadas

"ameboporos", las cuales pueden estar implicadas en la muerte celular. El mecanismo de acción probablemente sea similar al del sistema inmune empleado por el complemento (Young, 1985).

La capacidad de penetrar, invadir y destruir los tejidos conjuntivos de los órganos que infectan los trofozoítos en el hospedero, podría ser por la participación, entre otros factores, de una enzima colagenolítica, ya que la colágena es uno de los principales componentes estructurales del tejido conjuntivo.

Se conocen diferentes variedades genéticas de colágena, las cuales se presentan en zonas específicas de los tejidos. La colágena de tipo I es el principal componente del tendón, hueso y dientes, en asociación con otras colágenas se encuentra presente en la piel, hígado, riñón, pulmón y otros órganos. La colágena de tipo II se presenta en tejido de cartilago elástico hialino, la colágena de tipo III se presenta en casi todos los tejidos que contienen la colágena de tipo I. La colágena de tipo IV se presenta en membrana basal, la de tipo V en células de músculo liso, en la piel y en la membrana basal (Minor, 1980). Recientemente se ha correlacionado el grado de virulencia del parásito con su actividad colagenolítica (Muñoz, 1984). Así mismo en este estudio se observó que el trofozoíto presentó una mayor afinidad por la colágena de tipo I aislada de placenta humana. Alternativamente, experimentos de microscopía electrónica de transmisión han

revelado la existencia de gránulos electrodensos (GED), o gránulos de secreción, en trofozoítos activados con colágena tipo I como sustrato (Martínez-Palomo y cols., 1987).

IV) SECRECIÓN EN CELULAS EUCARIOTICAS SUPERIORES

El proceso de secreción en células eucariotes se ha esclarecido en los últimos años. Se han discernido mecanismos moleculares y celulares durante el proceso de secreción. La ruta intracelular para la secreción de proteínas en células eucariotes incluye seis pasos principales : 1) la síntesis de proteínas en los ribosomas unidos al retículo endoplasmático; 2) segregación de las proteínas nacientes dentro del espacio cisternal del retículo endoplásmico rugoso (RER); 3) transporte intracelular desde el RER hacia el aparato de Golgi; 4) condensación en los gránulos de secreción inmaduros sobre la cara trans del aparato de Golgi; 5) almacenamiento de los productos de secreción en los gránulos de secreción maduros y 6) liberación de los productos al medio extracelular a través de la exocitosis (Carne, 1984).

Existen dos regiones espaciales en la célula: el extraorganelar o citosol, el cual contiene el RNAm, ribosomas, aminoácidos activados y factores para la síntesis de proteínas, el otro espacio es el intraorganelar o cisternal el cual canaliza los productos de secreción a la superficie celular. En este espacio es característico la

modificación post-translacional en las proteínas (glucosilación, uniones disulfuro, reducción proteolítica, hidroxilación, fosforilación y sulfatación) antes de ser liberadas por la célula. La parte central del proceso de secreción es la translocación de las proteínas secretorias, desde su sitio de síntesis hasta el espacio citosólico, atravesando la membrana del RER hacia el espacio cisternal (Carne, 1984).

La canalización de estas proteínas es a través de una serie de interconexiones unidas a membranas, transportando las moléculas en pequeñas vesículas o gránulos citoplasmáticos (Carne, 1984). Por otra parte, se ha detectado que son los incrementos de calcio citoplasmático los responsables directos de la activación de este proceso (Douglas y cols., 1978).

En resumen podemos mencionar que el mecanismo invasor del parásito E. histolytica involucra aspectos celulares y moleculares, de los cuales los primeros han sido objeto de una gran variedad de investigaciones, sin embargo, los aspectos moleculares han sido poco estudiados. Por tanto el objetivo principal de este trabajo fué estudiar el proceso de secreción en trofozoítos de E. histolytica durante su activación con colágena tipo I, usando anticuerpos específicos para los gránulos de secreción (GED).

V) OBJETIVOS

- A) DETECTAR LOS COMPONENTES DE LOS GED EN TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica NORMALES Y ACTIVADOS PARA LA SECRECION, EMPLEANDO ANTICUERPOS POLICLONALES DE MAMIFERO.
- B) LOCALIZAR LOS COMPONENTES DE LOS GED EN TROFOZOITOS DE Entamoeba histolytica.
- C) ESTUDIAR LA REDISTRIBUCION DE LOS COMPONENTES DE LOS GED EN TROFOZOITOS ACTIVADOS PARA LA SECRECION.

VI) METODOS

a) **CULTIVO DE TROFOZOITOS DE E. histolytica.** Los trofozoitos de E. histolytica cepa HM-1 fueron crecidos en medio TYI-S-33 en condiciones axénicas conforme el método descrito por Diamond, (1978).

Cultivo axénico de medio TYI-S-33

1) Para 1000ml del medio de cultivo se pesaron:

Biotriptasa 30g
Dextrosa 10g
Cloruro de sodio 2g
Fosfato dibásico de potasio 0.6g
Fosfato monobásico de potasio 1g
L-cisteína 1g
Acido ascorbico 0.2g
Citrato férrico de amonio 0.023g

2) Enseguida se disolvieron en 500ml de agua bidestilada y se ajustó a un pH de 6.8 con NaOH 1N para luego aforarse a 800 ml; posteriormente se esterilizó por autoclave durante 15 minutos. El medio TYI-S-33 se complemento con suero de bovino inactivado (se colocó en un baño de agua a 56°C durante 30 minutos con agitación constante) y con vitaminas de Diamond.

b) EXTRACCION DE COLAGENA TIPO I DE PLACENTA HUMANA. La colágena tipo I se extrajo siguiendo el método descrito por Rojkind y colaboradores 1982. Donde una placenta humana se cortó y lavó con NaCl 0.9% durante 24 h a 4°C. Posteriormente se incubó con ácido acético 0.25M con 0.2mg de pep-sina/ μ l. Después se centrifugó a 5000 rpm durante 40 min,

el sobrenadante se neutralizó con NaOH 1M. Este proceso se repitió tres veces consecutivas para la separación de las colágenas tipo III, I y V, donde se procedió a dializar el sobrenadante a 4°C en el siguiente orden:

- 1) Tris-HCl 0.05M pH 7.2 con NaCl 0.45M.
- 2) Tris-HCl 0.05M pH 7.2 con NaCl 1.7M para la colágena tipo III.
- 3) Tris-HCl 0.05M pH 7.2 con NaCl 2.5M para la colágena tipo I.
- 4) Tris-HCl 0.05M pH 7.2 con NaCl 4M para la colágena tipo V.

Los precipitados formados en cada una de las diálisis se disolvieron en ácido acético 0.25M durante 48 h y dializaron en ácido acético 0.025M, se liofilizaron y almacenaron a 4°C.

c) **CINETICA DE SECRECION.** Trofozoítos de E. histolytica cepa HM-1 se cosecharon a las 48 y 72h. Con el objeto de separar a las amibas adheridas a los tubos de cultivo, se enfriaron durante 5min en agua-hielo. Posteriormente se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.0 (PBS-A) y se centrifugaron 5min a 1000rpm. Una vez colectadas las amibas se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en medio modificado TYI-S-33 (sin suero y sin L-cisteína) conteniendo colágena tipo I con una concentración final de 1mg/ml incubándose esta suspensión a 37°C. La cinética de secreción se realizó en los tiempos

de 3, 6 y 15 h.

d) PREPARACION DE ANTIGENO AMIBIANO. El antígeno para ELISA se preparó con trofozoítos cosechados a las 72 h. Se colectaron mediante centrifugación durante 5min a 1000rpm, se lavaron con PBS-A en dos ocasiones, finalmente la pastilla se resuspendió en para-hidroxi-mercuri-benzoato (p-HMB) como inhibidor de proteasas, se sonicó y cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry (1951) para luego ser almacenados a 4°C. El antígeno para electroforesis se procesó de igual manera, solo que en lugar de sonicar la muestra, ésta se hirvió durante 3min y almacenó a -20°C. Los antígenos de amibas activadas por 3, 6 y 15 h se procesaron de la misma forma.

e) OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI GRANULOS. Se cultivaron trofozoítos de 48 h y se activaron para la secreción con una concentración de colágena de 8mg/30ml/ 3×10^6 células, durante 15 h a 37°C. Se centrifugó la suspensión a 1000rpm durante 10min., posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 2000rpm por 5min. Finalmente el sobrenadante se microfugó a 10,000rpm por 10min. La pastilla formada se sonicó y resuspendió en adyuvante completo de Freund, luego se inoculó a un borrego de 15 kg. Se realizaron un total de tres inmunizaciones vía subcutánea. Una vez que el borrego adquirió inmunidad a los gránulos este se sangró, y el suero obtenido fué procesado para la precipitación de las

inmunoglobulinas de isotipo G.

f) PRECIPITACION DE INMUNOGLOBULINAS. Se diluyó 1 ml de suero en 5ml de amortiguador de boratos 5mM pH 8.5 . Posteriormente se agregó el sulfato de amonio saturado por goteo, agitación constante y en frío, luego se dejó reposar 30min y se centrifugó a 10,000rpm. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en amortiguador de boratos. Finalmente la suspensión se dializó contra un volumen de 500ml de amortiguador durante 48 a 60 h a 4°C (Goding, 1983). Al dializado se le cuantificó proteína utilizando 50µl de muestra y 950µl de NaOH 0.1N y se leyó a 280nm.

Para calcular la concentración de proteína se utilizó la siguiente fórmula:

$$(1.66) (D.O.) / (\text{factor de dilución}) = \text{mg/ml}$$

g) INMUNOQUIMICA E INMUNOCITOQUIMICA. A continuación se describe en forma breve los principales aspectos sobre el fundamento de ambas técnicas.

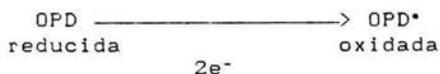
1) ELISA: " Técnica del anticuerpo inmunoabsorbente unido a una enzima " . Esta técnica se basa en la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Para lograr esta interacción se forra una placa de plástico (poliestireno) con el antígeno correspondiente (en concentración de proteína y volumen final conocido). Posteriormente la placa se incuba a 37°C, para permitir la adhesión de las

moléculas del antígeno al plástico. El paso siguiente consiste en la unión del anticuerpo al antígeno, esto se logra con una posterior incubación a 37°C del anticuerpo (suero o IgG) en diluciones seriadas (Voller y cols., 1979).

Para la visualización del complejo Ag-Ac, es necesario la participación de un segundo anticuerpo, el cual está dirigido contra el primero y además está acoplado a una enzima (AcE). La enzima acoplada a este anticuerpo, por lo general es la peroxidasa (PO), en su mayoría aislada de rábano. El complejo final será Ag-Ac-AcPO, para su observación es indispensable que la enzima interactue con el sustrato específico. En el caso de la peroxidasa la reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



A continuación los electrones libres del Oxígeno serán captados por un colorante; el cual hará evidente esta reacción. La orto-fenil-diamina (OPD) es un compuesto que desarrolla un color amarillo-naranja cuando se oxida en presencia de electrones (Martínez, 1979). El espectro de absorción para este complejo es de 490nm. La reacción que se desencadena cuando la OPD se oxida es la siguiente:



Por lo tanto, el desarrollo de color indica la

presencia del complejo Ag-Ac (Martínez, 1979).

Para la interpretación de los resultados, es necesario leer la placa en un MINI-READER (lector para ELISA) a 490nm, registrando los datos en densidades ópticas (D.O.). Finalmente los resultados se grafican en papel milimétrico, donde en el eje de las ordenadas se registran las diluciones del anticuerpo y en el eje de las abscisas se anota las D.O. registradas por el lector. (Voller y cols., 1979).

II) INMUNOFLORESCENCIA: El uso de derivados fluorescentes acoplados a anticuerpos para localizar antígenos, fué empleado por primera vez por Coons (1941). Demostrando que los anticuerpos se pueden acoplar a β -antraseno o isocianato de fluoresceína, conservando la unión al antígeno. Subsecuentemente, Riggs (1958) introdujo el isotiocianato de fluoresceína (FITC) el cual es más estable, por lo cual es uno de los fluorocromos más empleados en los últimos años. Así mismo se concluyó que el uso de anticuerpos acoplados a moléculas fluorescentes son de gran utilidad para localizar antígenos.

El principio de la fluorescencia se basa en la luz que es absorbida por los fluorocromos, donde la energía de los fotones es transferida a electrones, los cuales asumen niveles de energía más elevados. Cuando los electrones retornan a niveles de energía mas bajos, con respecto a los del estado exitado, se libera parte de esta energía en forma

de calor y el resto en forma de un fotón de baja energía (comparado al del foton inicial). A este fenómeno se le denomina fluorescencia y la eficiencia de éste se conoce como "producción de quantum" (Crooks, 1978).

El espectro de emisión producido por el fluorocromo puede ser captado por el Microscopio de Fluorescencia. El sistema óptico del microscopio procesará las longitudes de onda producidas por el fluorocromo; dicho proceso consiste en la condensación de las longitudes de onda emitidas por una lámpara de mercurio y su posterior paso através de una serie de lentes, para luego interactuar con la longitud de onda correspondiente al del espectro de emisión del fluorocromo lo que permite la visualización de la fluorescencia la cual dependerá del filtro que se haya seleccionado y del fluorocromo empleado (Goding, 1983).

Las bases de la Inmunolocalización de antígenos empleando la técnica de la fluorescencia se rigen por la localización del antígeno problema, empleando un anticuerpo primario, posteriormente la formación del complejo Ag-Ac es detectado por un segundo anticuerpo acoplado a un fluorocromo (FITC). El complejo final, será entonces: Ag-Ac-AcFITC. La localización del antígeno se puede realizar en tejidos o células fijadas y procesadas para ser analizadas en Microscopio de Fluorescencia.

En éste caso se empleó el fluorocromo (FITC) el cual desarrolla un color verde brillante, cuando su espectro

de emisión interactúa con las longitudes de onda emitidas por la lámpara de mercurio.

En ambas técnicas (ELISA e inmunofluorescencia) se empleó el método indirecto con el sistema de la proteína-A biotinilada y estreptoavidina-PO o avidina-FITC. Por lo que la técnica esta modificada en cuestión de la participación de un segundo anticuerpo marcado, en su lugar se utilizan las proteínas mencionadas anteriormente. El principio de este sistema se basa en las propiedades bioquímicas que poseen estas proteínas (Green, 1975). La proteína-A, es extraída del Estafilococo, como característica importante posee una elevada afinidad por la región Fc de las inmunoglobulinas de isotipo G (IgG) de varias especies. Lo cual se aprovecha para la detección de las IgG dirigidas contra un antígeno específico. Esta proteína es acoplada a una vitamina de la serie B, llamada biotina, que presenta una elevada afinidad por la avidina (proteína formada en la clara de huevo). La avidina es un tetrámero de subunidades idénticas, cada una posee un peso molecular de 15 000 Mr, con un punto isoeléctrico de 10.5, con una afinidad por la biotina de $10^{-7}M$. El complejo biotina-avidina ha sido usado ampliamente en Biología Celular para la localización específica de antígenos en citoplasma o en membranas (Bayer y cols., 1979).

El sistema de la biotina-avidina es particularmente atractivo en los sistemas de "sandwich", en conjunción con el uso de la proteína A, para la localización

de antígenos en células fijadas y permeabilizadas. Dado que la biotina es relativamente polar, ésta se puede acoplar a la proteína-A, mientras que la avidina se acopla a fluorocromos, enzimas, ferritina u otras moléculas. La extremada naturaleza básica de la avidina ($pI=10$) permite la unión electrostática a estructuras acídicas. Cuando se emplea avidina-FITC para marcar células fijadas y permeabilizadas, ésta se observa en la cromatina condensada (Heggeness, 1977). La unión de la avidina a DNA puede ser abatida con concentraciones de sales (0.3M KCl) (Heggeness, 1977). Una alternativa a la avidina es la estreptoavidina, una proteína que se une a la biotina, que se extrae de Streptomicetos. La estreptoavidina contiene cuatro cadenas de peso molecular idéntico a las de la avidina. Sin embargo, el análisis de aminoácidos muestra que la estreptoavidina posee menos aminoácidos básicos en comparación a la avidina, lo cual le permite tener un pI más bajo y por lo tanto no posee una afinidad por la cromatina en núcleo (Chalet, 1964).

En nuestro caso se empleó avidina-FITC y estreptoavidina-PO. El complejo formado por estas proteínas se esquematiza en la figura (1).

En breve se mencionan los protocolos utilizados para el ELISA e INMUNOFLUORESCENCIA con el sistema de la proteína-A biotinilada y estreptoavidina-PO o avidina-FITC.

ELISA

- 1) Se forraron placas de poliestireno con 50µl de antígeno amibiano normal y activado a 3,6 y 15hr de incubación con la colágena tipo I. La concentración de proteína fué de 10µg/pozo, diluida en amortiguador de carbonatos pH 9.6. Luego se incubó a 4°C durante toda la noche.
- 2) Se aspiró y lavó con PBS-Tween 0.05% 2 veces.
- 3) Se bloqueó los sitios no ocupados por el antígeno en los pozos de poliestireno, con gelatina 0.5%-PBS-Tween 0.05% incubando a 37°C durante 1 hora 30 minutos.
- 4) Se aspiró y lavó con PBS-Tween 0.05% 2 veces.
- 5) Se incubó con IgG anti gránulos con diluciones seriadas. La incubación fue durante 1 hora 30 minutos a 37°C.
- 6) Se aspiró y lavó con PBS-Tween 0.05% 3 veces.
- 7) Se incubó con proteína-A biotinilada con una dilución de 1:2000 (dilución obtenida despues de haber titulado la proteína por el mismo método) a 37°C durante 1 hora 30 minutos.
- 8) Se aspiró y lavó con PBS-Tween 0.05% 3 veces.
- 9) Se incubó con estreptoavidina-PO con una dilución de 1:4000, durante 1 hora 30 minutos a 37°C.
- 10) Se aspiró y lavó con PBS-Tween 0.05% 3 veces.
- 11) Se reveló con 50µl de la siguiente solución:

Amortiguador citrato-fosfato	10ml
orto-fenil-diamina	4mg
H ₂ O ₂	4µl

Es importante que al preparar esta solución se haga en un tubo forrado con papel aluminio. El desarrollo de color es aproximadamente en un lapso de tiempo de 3min. Posteriormente se para la reacción con ácido sulfúrico 2.5N.

12) Se leyó a 490nm en el Lector para ELISA.

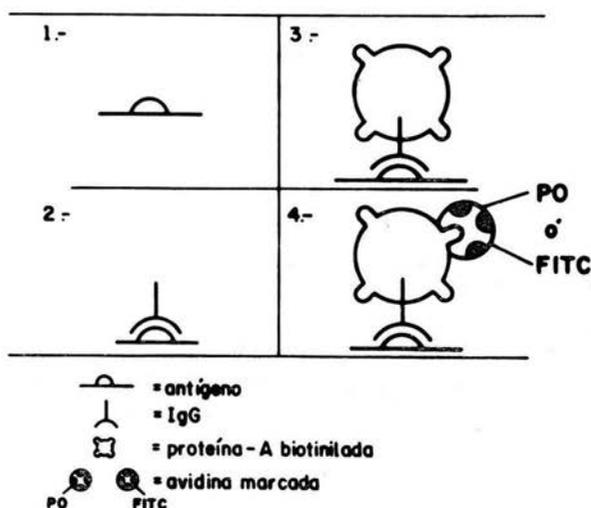


FIGURA 1

Sistema de inmunodetección empleando el método de la proteína A-biotinizada y avidina marcada. En 1 se muestra el Ag, en 2 la formación del complejo Ag-Ac. La afinidad de la proteína A-biotinizada hacia la región Fc del Ac se presenta en 3. Para la visualización del complejo formado se necesita de la avidina marcada con FITC o PO (4). En este caso se empleó estreptoavidina, la cual es idéntica a la avidina.

INMUNOFLUORESCENCIA.

- 1) Se lavaron trofozoítos de 48 hrs de crecimiento con PBS-A 2 veces, recuperados después de haber enfriado los tubos de cultivo 5min con agua-hielo y centrifugando las células a 1000rpm. En el caso de trofozoítos activados para la secreción con la colágena, las células fueron recuperadas enfriando solamente el tubo con agua-hielo durante 5 minutos, posteriormente las células fueron lavadas con medio modificado (sin suero y sin L-cisteína) con una temperatura de 37°C.
- 2) Se fijaron con una mezcla de formaldehído 1.85%-glutaraldehído 0.125% en PBS, a 37°C y con agitación constante, esto con el fin de evitar agregados celulares.
- 3) Se lavaron con NaCl 0.95% 2 veces.
- 4) Se incubaron con glicina 1M-PBS 15min a 37°C con agitación constante.
- 5) Se lavaron con tritón X-100 0.3% en NaCl 0.95% 3 veces.
- 6) Para abatir la fluorescencia inespecífica se incubó con una solución de azul de Evans 0.0025% - PBS, por 20min a 37°C. El volumen que se empleó fué en función del número de células que fueron procesadas (20µl/10⁶ células)
- 7) Se lavaron con tritón X-100 0.3%-NaCl 0.95% 3 veces. Se permeabilizaron con tritón X-100 0.5%-NaCl 0.95% 15min a 37°C con agitación constante.
- 8) Se lavaron con Tritón X-100 0.3%-NaCl 0.95% 2 veces.
- 9) Se incubaron con el anticuerpo IgG anti gránulos toda

la noche a 4°C. El volumen que se empleó fué de 20µl por cada 10⁸ células, la dilución empleada fué de 1:100 en PBS.

10) Se lavaron con tritón X-100-NaCl 0.95% 3 veces con agitación ocasional.

11) Se incubaron con la proteína-A biotinilada durante hora 30 minutos a 37°C. La dilución que se empleó fué de 1:200 en PBS.

12) Se lavaron con tritón X-100-NaCl 0.95% 3 veces con agitación ocasional.

13) Se incubó con la avidina-FITC durante 1 hora 30 minutos 37°C. La dilución que se empleó fué de 1:1000 en PBS o en PBS-KCl.

14) Se lavó con tritón X-100-NaCl 0.95% 3 veces con agitación ocasional.

15) Se resuspendió en glicerol 50%-PBS y se observó al Microscopio de Fluorescencia.

h) ELECTROFORESIS.

Se emplearon geles de poliacrilamida 12.5% - SDS con el método de Laemeli (1970). Las dimensiones del gel fueron de 5.5cm de largo y 8cm de ancho, la cámara que se empleó fue una Hoefer Scientific Instruments (modelo SE 250)

Para relizar los geles se montó la cámara de electroforesis. El proceso de montaje consistió en colocar sobre la cámara las placas de aluminio, en seguida se sobrepusó una placa de vidrio en cada una de las placas;

entre ambas se colocó una costilla de 0.5mm de grosor, finalmente este complejo se presionó con un par de pinzas. Una vez montada la cámara se procedió a sellarla con agarosa al 1%.

La formación del gel consiste en colocar las mezcla del gel separador y luego la del concentrador mediante una pipeta Pasteur.

GEL SEPARADOR 12.5%		GEL CONCENTRADOR 3%	
	ml		ml
ACRILAMIDA (30%)	4.16		0.5
BIS-ACRILAMIDA (1%)	1.68		0.4
TRIS-HCl 2M pH 8.7	3.75		
TRIS-HCl 1M pH 6.8			0.625
H ₂ O	0.278		3.4
PERSULFATO DE AMONIO 10%	0.060		0.025
SDS 20%	0.05		0.025
TEMED	0.008		0.010

Una vez polimerizado el gel, se procesó la muestra de la siguiente manera:

1) Se tomaron 50 μ g de proteína de antígeno amibiano y se diluyó en un amortiguador para muestras, el cual contiene:

10X

TRIS 0.125M
GLICEROL 30%
SDS 5%
AZUL DE BROMOFENOL 2mg

2) En seguida se hirvió y se colocó en el gel con ayuda de una pipeta Pasteur. El voltaje que se empleó para correr el gel concentrador fué de 15 mili-amperios y para el separador fué de 25 mili-amperios. El amortiguador

empleado para la corrida del gel fué:

5X

TRIS 0.25M
GLICINA 0.192M
SDS 0.1%
AFORAR CON H₂O DESTILADA A 1 litro

Así mismo, se corrieron geles con colágena tipo I extraída de placenta humana, la concentración empleada fué de 1mg de proteína en peso seco y por último los marcadores de bajo peso molecular, la forma de prepararlos fué la siguiente: se disolvieron en 100µl de amortiguador de muestra y luego se hirvieron durante 3min.

TINCION DE GELES.

Se tiñeron los geles con las muestras de antígeno amibiano, de colágena y con los marcadores con las siguientes soluciones:

AZUL DE COOMASSIE	1.25g
METANOL	227ml
AGUA DESTILADA	227ml
AC.AC.GLACIAL	46ml

Se incubó el gel en esta solución toda la noche a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente se destiñó el gel durante 1h con la siguiente solución:

ETANOL	1,500ml
AC.AC.GLACIAL	500ml
AGUA DESTILADA	3,000ml

i) INMUNOTRANSFERENCIA.

Una vez obtenido los patrones electroforéticos de

los antígenos normales, activados y de colágena se procedió a transferirlos conforme la técnica descrita por Towbin (1979).

El proceso consiste en las siguientes etapas.

I) Preparación del gel. Se lavó 2 ocasiones con amortiguador de transferencia durante 30 min, lo cual se repitió para cada lavado del gel. Las soluciones que se emplearon para la preparación de este amortiguador fueron los siguientes:

5 X pH 8.3

Tris 25mM

Glicina 192mM.

Aforar con agua destilada a 2 litros

Para emplear el amortiguador, se mezcló con metanol y agua, en las proporciones siguientes:

800ml de Glicina-Tris pH 8.3

800ml de Metanol absoluto

2400ml de agua destilada

II) En seguida se cortó un trozo de papel de nitrocelulosa (PNC) con las dimensiones exactas a las del gel de poliacrilamida. Posteriormente se equilibró con amortiguador de transferencia por 30 min, en agitación constante y se procedió a colocarlo para la transferencia.

III) Colocación.

a) Se humedecieron 2 trozos de papel Wattman del tamaño del gel, en amortiguador de transferencia.

b) En un trozo de papel Wattman se colocó el gel con el frente hacia delante, luego se empalmó el PNC añadiendo finalmente el otro papel Wattman, asegurándose que no se formen burbujas entre el gel y los papeles. En seguida se

colocaron 2 fibras, cada una quedando sobrepuesta al papel Wattman. Para terminar, se colocó éste complejo en la cámara de transferencia con amortiguador glicina-tris pH 8.3, metanol-agua a 4°C durante 1 hora 30 minutos. Es importante colocarlo con la orientación del gel hacia el cátodo y el PNC hacia el ánodo. Para la transferencia se emplearon 100 mili-voltios durante 1 hora 30 minutos.

IV) La cuarta etapa de la inmunotransferencia consistió en la detección de proteínas de los GED por el método de tinción de PNC con anticuerpos policlonales, de acuerdo al método descrito por Hans-Peter Hauri (1986). El método consistió en las siguientes etapas.

A) Se lavó el PNC transferido con PBS 2 veces con agitación constante durante 5 minutos.

B) Se marcó el PNC con lápiz

C) Se bloqueó con leche descremada Sveltes al 1.5% en PBS-tween 0.05% 1 hora a temperatura ambiente (TA) con agitación.

D) Se lavó el papel bloqueado 3 veces con PBS-A 5min en cada lavado.

E) Se incubó con IgG de borrego anti GED en leche descremada al 1.5% durante toda la noche a 4°C con agitación constante.

F) Se lavó con PBS-A 10min.

G) Se lavó con PBS-Tween 10 min.

H) Se lavó con PBS-A 10 min.

I) Se incubó con el segundo anticuerpo acoplado con peroxidasa IgG de conejo anti IgG de borrego-PO (IgGC anti IgGB-PO) incubando 1 hora 30 minutos a TA en agitación constante.

J) Se lavó con PBS-A 10 min.

K) Se lavó con PBS-Tween 10 min.

L) Se lavó 2 veces con amortiguador de fosfatos 50mM frío 5 min en cada ocasión.

Solución madre NaHPO₄ 50mM pH 7.4

M) Se preincubó con el siguiente amortiguador durante 10 min.

a) Solución NiCo
Cloruro de Niquel (NiCl) 30mg
Cloruro de Cobalto (CoCl) 30mg
Agua destilada 3ml.

b) Diaminobencidina (DAB) 50mg amortiguador de fosfatos, agitándolo 40min y filtrándolo antes de emplearlo.

N) Se aspiró el amortiguador de preincubación con una trampa al vacío y se incubó posteriormente con el amortiguador de revelado el cual se preparó de la misma manera que el de preincubación pero adicionándole Peróxido de Hidrógeno al 1% 10min a TA con agitación constante.

O) Se lavó 4 veces con agua destilada y guardó en seco.

Finalmente, las bandas que presentaron reconocimiento con el anticuerpo IgG anti GED, serán aquellas que pertenezcan a las proteínas de los componentes de los GED en antígeno normal y activado.

VII) RESULTADOS

a) LOCALIZACION DE CROMATINA CONDENSADA EN NUCLEOS DE TROFOZOITOS ACTIVADOS PARA LA SECRECION.

Se incubaron trofozoitos activados únicamente con avidina-FITC, los patrones fluorescentes encontrados para cada tiempo de secreción fueron los siguientes:

A) En trofozoitos activados por 3 h, la fluorescencia se concentró en todo el núcleo, la consistencia de esta marca fué bastante compacta. En este tiempo de activación es característico detectar un solo núcleo fluorescente por cada célula, el cual abarco gran parte del citoplasma; en lo que concierne a éste se detectó marca tenue en forma granular de tamaño muy pequeño (figura 2).

B) Los núcleos de trofozoitos activados a las 6 h mostraron fluorescencia en toda la periferia de la membrana nuclear. Su apariencia asemeja un collar brillante, en donde las cuentas se presentaron punteadas, es decir, existe un espacio entre cada una de ellas. Algo interesante, es que para este tiempo de activación, el nucleoplasma careció de fluorescencia. Así mismo se observó otro patrón fluorescente, el cual consistió en la polarización de la marca hacia la periferia del núcleo. En adición, se pudo apreciar que en cada célula se presentaron por lo menos dos núcleos con fluorescencia (figura 3).

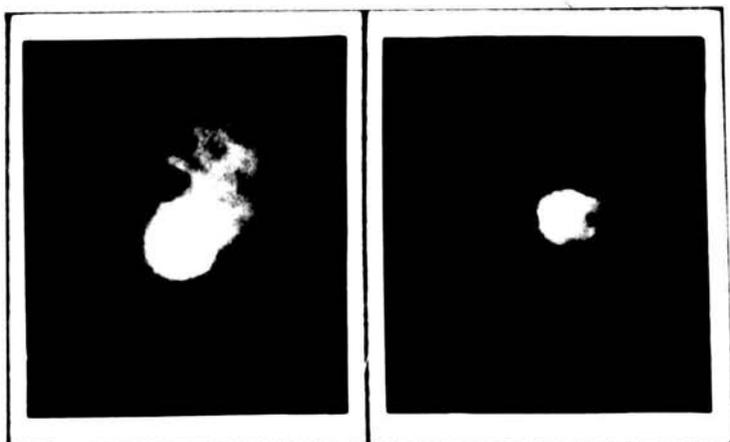


FIGURA 2

Localización de cromatina en trofozoitos activados por 3 h. Células fijadas y permeabilizadas fueron incubadas con avidina-FITC durante 1h a 37°C. En este tiempo de activación con colágena se pudo observar que el núcleo está totalmente fluorescente con una apariencia altamente compacta.



FIGURA 3

Localización de cromatina en trofozoítos activados con colágena por 6 h de incubación. Células fijadas y permeabilizadas se incubaron únicamente con avidina-FITC. La marca fluorescente se localizó polarizada hacia la membrana nuclear o alrededor de la misma formando collares fluorescentes.

C) En los trofozoítos de 15 h de activación la fluorescencia se presentó inmersa en todo el nucleoplasma, la forma de ésta marca, fué granular de tamaño considerablemente más grande que los observados en el tiempo de 6 h de activación. Por otra parte la membrana nuclear careció de marca, no obstante en el citoplasma se detectó fondo fluorescente su apariencia fué granular delimitando huecos en la célula. El número de núcleos marcados en este tiempo de activación fué mayor comparado a los encontrados en los tiempos anteriores (entre 3 y 5 núcleos) (figura 4).

D) Para el tiempo cero de activación, el cual corresponde a los trofozoítos normales, el tipo de fluorescencia abarcó los patrones fluorescentes encontrados en los tiempos 3, 6 y 15 h de activación para el proceso de secreción.

b) DETECCIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS GED POR EL METODO DE ELISA.

Empleando la técnica inmunoenzimática ELISA con el sistema de la proteína-A biotinilada y estreptoavidina peroxidasa se lograron detectar los GED en antígeno ambiano normal y activado para la secreción. El reconocimiento del IgG anti- gránulos para el antígeno normal fué de 0.60 D.O., siendo ligeramente mayor para el antígeno activado por 3 h (0.62 D.O.). Sin embargo para los antígenos provenientes de células activadas por mayor tiempo, el reconocimiento fué disminuyendo hasta 0.18 D.O. (figura 5). La sensibilidad

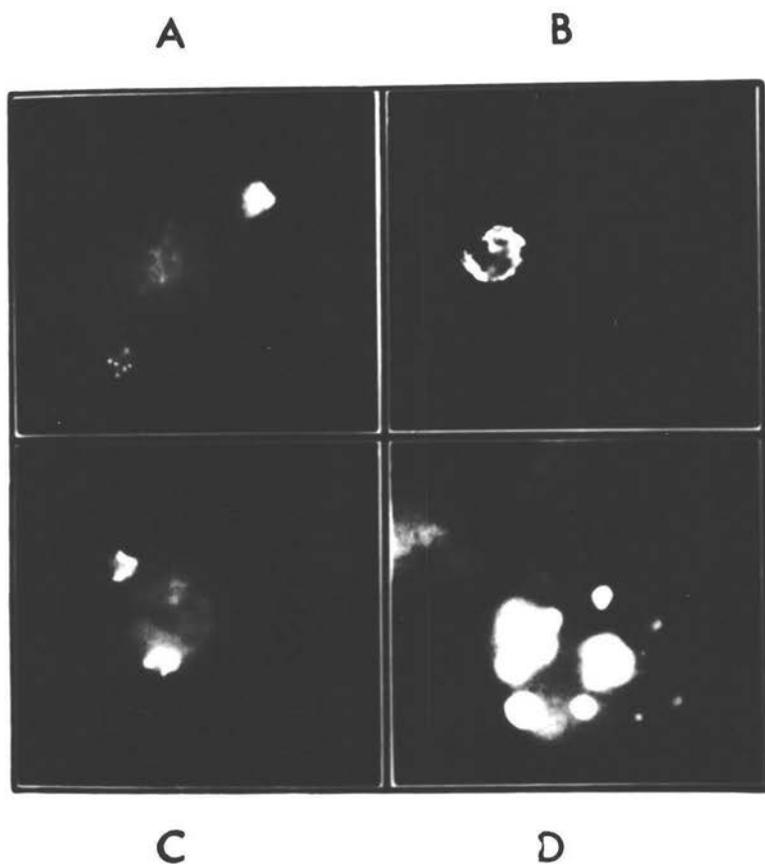


FIGURA 4

Localización de cromatina en trofozoitos activados con colágena por 15 h. Se fijaron y permeabilizaron las células para luego incubarlas únicamente con avidina-FITC. Las células presentaron la marca inmersa en el nucleoplasma (A,B,C). En este tiempo de activación fué típico encontrar más de 3 núcleos con marca (D).

del reconocimiento del IgG anti-gránulos por los antígenos amibianos fué del orden de los microgramos.

c) LOCALIZACION DE LOS COMPONENTES DE LOS GED POR INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.

Utilizando el sistema de la proteína-A biotinilada y avidina-FITC se lograron localizar los componentes de los GED empleando el anticuerpo anti-gránulos (IgG anti GED) con una solución de KCl 3M en trofozoitos normales y activados para la secreción.

I) Empleando la combinación de KCl e IgG anti GED, se logró obtener el patrón fluorescente basal en cada uno de los tiempos de activación, esta fluorescencia no presentó diferencias significativas, en comparación a la detectada en ausencia de KCl, lo que nos indica que la afinidad de la avidina-FITC por los componentes de los GED, detectados por el anticuerpo es altamente específica (figura 6). Por otra parte se incubaron geles de colágena a pH 7 con IgG anti GED y avidina-FITC, con el fin de probar la especificidad del anticuerpo por los GED. El resultado fué negativo, lo que indica que este anticuerpo no reconoce a la colágena (figura 7).

II) En los trofozoitos normales se observó una fluorescencia homogénea y de forma difusa en el citoplasma. Sin embargo fué evidente la afinidad de la marca por la membrana del núcleo y de las vacuolas. No obstante en la

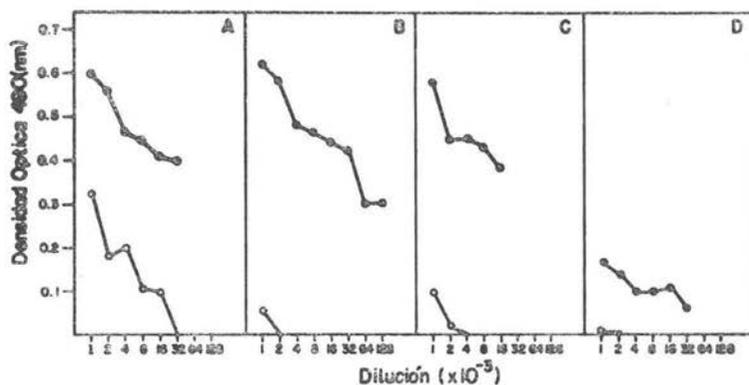


FIGURA 5

Detección de los componentes de los GED por el método de ELISA. En A se muestra el reconocimiento del anti-GED con antígeno total de *Entamoeba histolytica* no activado. ●-● muestra la incubación con el IgG anti GED, ○-○ muestra la incubación del antígeno con la IgG normal. En B, C y D se indica el reconocimiento de IgG anti GED por los antígenos totales de *Entamoeba histolytica* activados con colágena durante 3, 6 y 15 h. En la gráfica en las ordenadas se registra las diluciones de los anticuerpos y en las abscisas las D.O. a 490 nm.

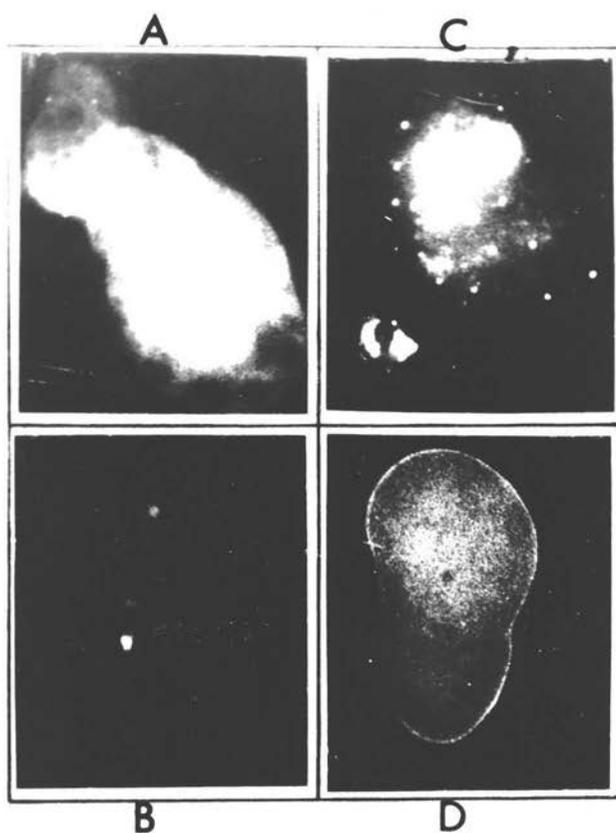


FIGURA 6

Inmunolocalización de los componentes de los GED en trofozoitos incubados con KCl. Células normales y activadas por 3, 6 y 15 h, fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con IgG anti GED más KCl 0.3M. La fluorescencia mostrada en A representa la localización basal de los GED en células normales, B 3 h, C 6 h y D 15 h de activación con colágena tipo I.

**FIGURA 7**

Gel de colágena incubado con anticuerpo anti GED. Se disolvió colágena tipo I en ácido acético 0.25M, se neutralizó con tris-base y se polimerizó a 37°C durante 1h. Posteriormente se incubó con IgG anti GED, proteína A-biotinilada y avidina FITC.

membrana plasmática se apreció disminuida la afinidad, ya que solo se delimito en forma tenue. Ocasionalmente se pudo observar agregados fluorescentes en el citoplasma, su constitución asemejó un "tamizado brillante" localizándose exclusivamente en esta zona, adicionalmente se observó una delimitación en forma de "círculos vacíos" en el interior de la célula. Por otra parte, la fluorescencia detectada en núcleo y vacuola no se limitó a membranas, ya que también se presentó en el interior de estas estructuras en forma de puntillero tenue, con orientación hacia la periferia de estas estructuras (figura 8)

Los trofozoitos activados para la secreción por 3h mostraron un patrón de fluorescencia tenue alrededor de toda la membrana plasmática, así mismo se pudo apreciar que esta marca presentaba discontinuidades, dándole apariencia de un punteado granular fino. Se observaron agregados fluorescentes en el citoplasma, con dimensiones grandes y con apariencia de enrejado, generalmente se localizaron inmersos en el citoplasma, u orientados hacia la membrana plasmática, lográndose detectar de 1 a 2 agregados por célula (figura 9).

Los trofozoitos activados por 6 h presentaron fluorescencia en forma granular de apariencia altamente densa en todo el citoplasma, el tamaño de estos agregados fue variable, así como la ausencia de fluorescencia en la membrana plasmática (figura 10). Las células adheridas a la colágena mostraron fluorescencia, tanto en el citoplasma,

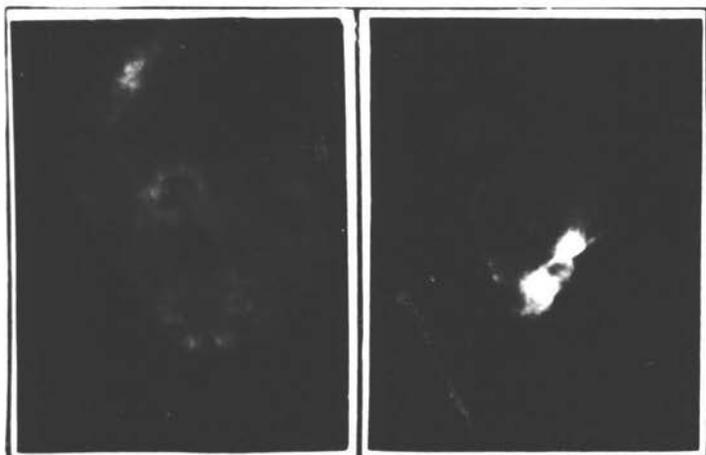


FIGURA 8

Inmunodetección de los GED en trofozoítos sin activar
Las células fueron fijadas y permeabilizadas como se describe en métodos. La fluorescencia se localizó principalmente en membranas de núcleos, vacuolas y de forma homogénea en todo el citoplasma.

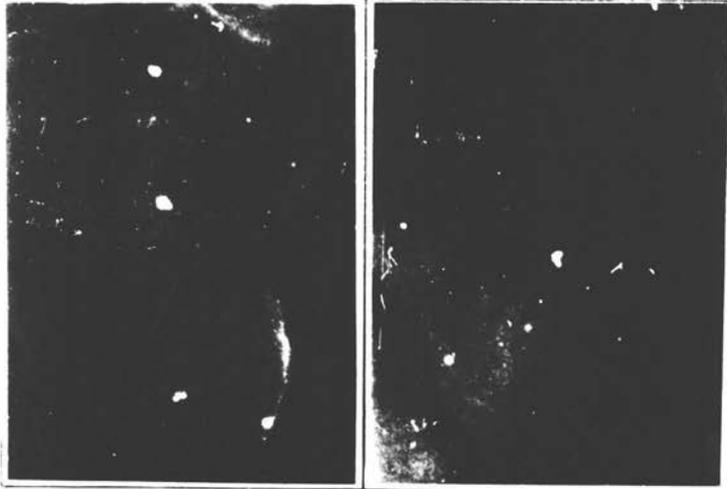


FIGURA 9

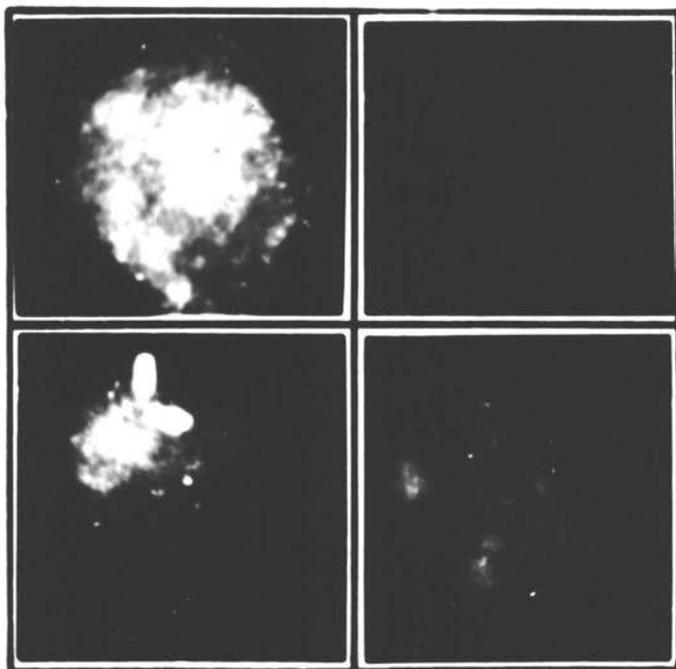
Inmunodetección de los GED en trofozoitos activados por 3h de incubación con colágena tipo I. Las células fueron procesadas como se describe en métodos. En este tiempo de activación se pudo apreciar que la distribución de la fluorescencia se encuentra localizada principalmente en gránulos orientados hacia la membrana plasmática o en el citoplasma.

como en zonas de contacto con la proteína. Por otra parte en este tiempo de activación, se encontró pequeños trozos de colágena no digerible con fluorescencia (figura 11).

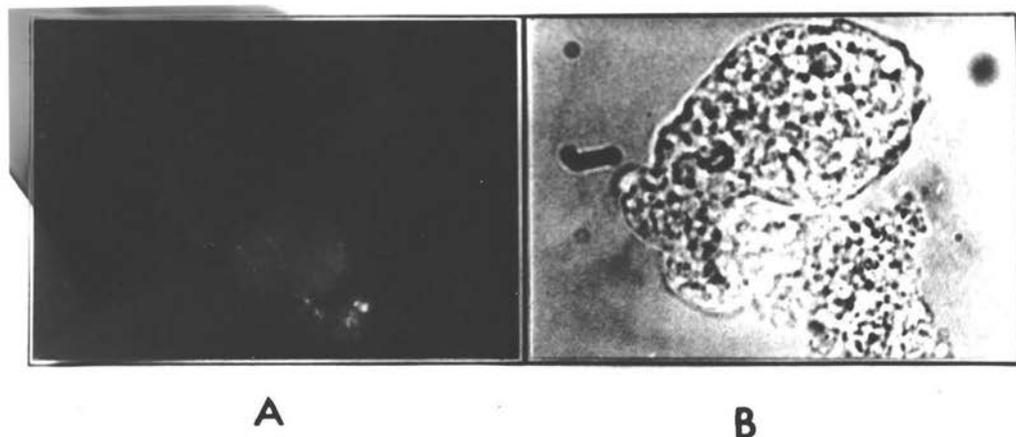
A las 15 h de activación, los trofozoítos mostraron marca únicamente en la membrana plasmática, no presentándola en el citoplasma o en cualquier otra estructura de la célula. La fluorescencia se observó en forma continua y se incrementó ligeramente con respecto a la detectada en los tiempos anteriores de activación. Así mismo en este tiempo de incubación es característica la ausencia de células marcadas con fluorescencia (figura 12).

d) RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS DE LOS GED POR EL ANTICUERPO IgG ANTI GED.

Por la técnica de inmunotransferencia se logró apreciar diferencias en el patrón proteico de los antígenos amibianos normales y activados. El patrón proteico de las amibas normales mostraron un reconocimiento de aproximadamente 10 bandas cuando se incubaron con el anticuerpo anti-GED, todas estas con pesos moleculares que oscilan entre 100 y 43 kDa (figura 13). Así mismo el obtenido para el antígeno activado por 6h se observó la aparición de bandas marcadamente enriquecidas, las cuales corresponden a pesos moleculares entre 100 y 105 kDa y de 35 a 20 kDa (figura 13). En lo que concierne al resto de las bandas éstas conservan la misma intensidad de tinción, lo cual nos sugiere una probable constancia de aparición en

**FIGURA 10**

Immunolocalización de los componentes de los GED en trofozoitos activados por 6h. Células incubadas con colágena por 6h fueron fijadas y permeabilizadas para luego ser procesadas como se describe en métodos. En todas las células se pudo observar una población de gránulos con tamaño heterogéneo. Así mismo se observó que las células carecen de marca en la membrana plasmática.

**FIGURA 11**

Inmunodetección de GED en colágena adherida a trofozoitos activados para la secreción. En (A) se muestra un trofozoito con marca fluorescente en citoplasma y en la fibra de colágena a la cual se adhiere. En (B) se observa la fotografía en campo de luz de la misma preparación, mostrando el trofozoito y la fibra de colágena.

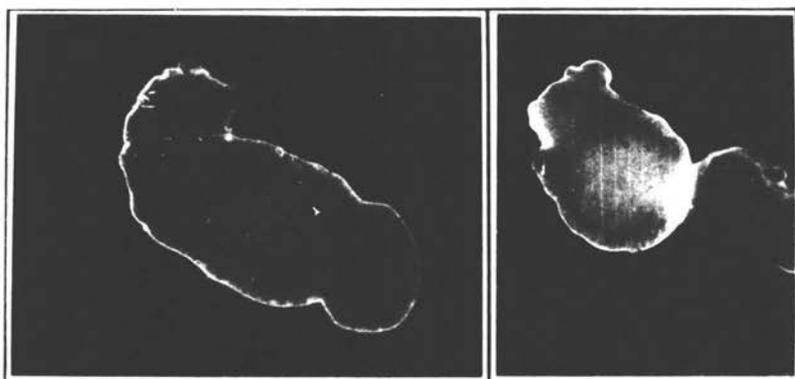


FIGURA 12

Immunolocalización de los GED en trofozoitos activados por 15h de incubación con colágena tipo I. En este tiempo de activación es típico encontrar células con marca fluorescente únicamente en la membrana plasmática.

los gránulos secretores durante la activación del proceso de secreción en las amibas. Esta posibilidad puede ser considerada tomando en cuenta que durante el proceso de maduración de los componentes de los gránulos hay proteínas que sufren cambios, donde en etapas finales la concentración de unas es mayor con respecto a otras.

Con el propósito de confirmar la especificidad del IgG anti GED se incubó éste con la colágena transferida. Los resultados mostraron que los anticuerpos no reconocen a la colágena, lo cual confirma que la obtención de los anticuerpos es específica por los componentes de los GED libres de contaminación por esta proteína (figura 14).

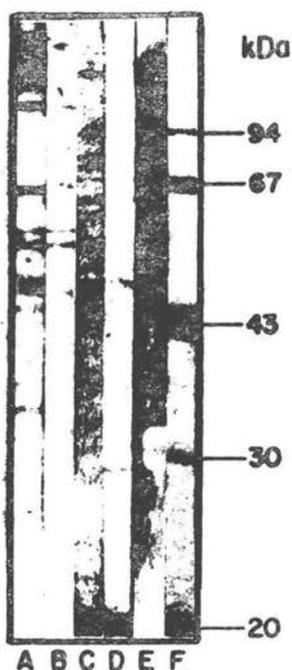


FIGURA 13

Reconocimiento de proteínas de los GED por el anticuerpo IgG anti GED. Se obtuvo el patrón proteico del antígeno amibiano por el método de inmunotransferencia descrito previamente. En (A) se muestra el reconocimiento del IgG anti GED por un antígeno total de *E. histolytica* activado por 6h de incubación con colágena, en (B) un antígeno de 15h de activación y el respectivo reconocimiento del IgG anti GED, en (C) el reconocimiento del anticuerpo por un antígeno normal. En el carril (D) se muestra un antígeno amibiano activado por 6h e incubado con un anticuerpo normal (IgG normal). El patrón proteico de *E. histolytica* normal se presenta en el carril (E), el cual se tiñó con tinta india, los marcadores de bajo peso molecular se presentan en (F).

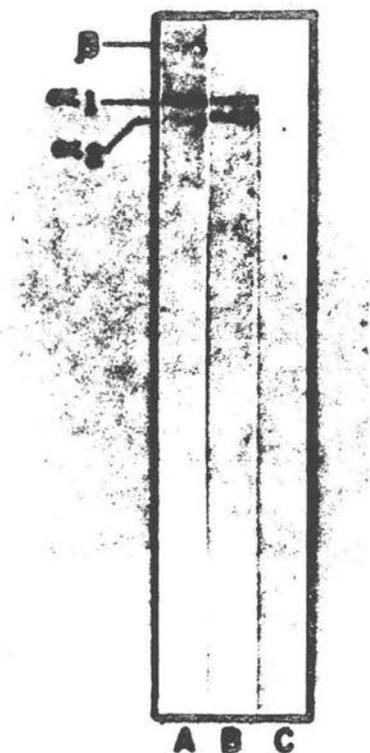


FIGURA 14

Especificidad de los IgG anti GED en colágena transferida. Se corrieron geles de colágena tipo I y se transfirieron para ser incubados con el anticuerpo IgG anti GED. En el carril (A) se muestra un gel de colágena teñido con azul de Coomassie. En (B) transferencia de colágena teñida con tinta india y en (C) incubación de la colágena transferida con el anticuepo IgG anti GED.

VIII) DISCUSION

Estudios ultraestructurales de la Entamoeba, han revelado características típicas de este protozooario, como son la ausencia de mitocondria y de nucleolo (Mc.Laughlin, 1985). Con respecto a otros organelos, se han identificado estructuras similares al retículo endoplasmático (Yee, 1970) y al aparato de Golgi (Proctor, 1971). La disposición de estas estructuras se da en la cercanía de vacuolas de tamaño pequeño. Así mismo parecen tener una distribución azarosa en todo el citoplasma.

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de secreción se caracteriza por la participación de RER, aparato de Golgi y gránulos (Carne, 1984).

En el sistema de secreción de la amiba es muy probable que éstos estén participando cuando se activa el proceso secretorio de este parásito. Las evidencias mostradas en este trabajo se limitan exclusivamente a observaciones realizadas en células fijadas y permeabilizadas inmunolocalizando los componentes de los GED por fluorescencia indirecta empleando un anticuerpo anti-GED específico en células activadas por diferentes tiempos. Durante este proceso se logró apreciar una probable maduración del contenido de los GED. En células no-activadas por colágena, los componentes de los GED se distribuyeron en la membrana plasmática, en la membrana nuclear y en el citoplasma. De esta manera

podemos sugerir que por lo menos algunas proteínas contenidas en los gránulos se presentan en estas estructuras quizá debido al elevado sistema de intercambio de membranas que ocurre en este organismo.

Durante la activación de la secreción hay un reconocimiento principalmente dirigido a pequeños gránulos, que conforme aumenta el proceso de secreción son más evidentes.

Recordando el patrón fluorescente del tiempo de 3h, observamos que casi no aparecen estos gránulos y que a las 6h aparecen éstos con una mayor frecuencia en todo el citoplasma, lo cual nos indica que:

La aparición de la marca depende del tiempo de activación, sugiriendo que el proceso de secreción de la amiba es gradual, denominándose a este proceso como secreción regulada (Kelly, 1985; Lynn, 1987) ya que es inducida por un estímulo, que en este caso es la colágena, y los productos finales se secretan en un tiempo prolongado, lo que se confirma por las observaciones a las 15 h en donde la marca ya no se observa en el citoplasma. Esto indica que estos gránulos son secretados al medio extracelular. Esta observación se apoya en los resultados obtenidos por ELISA, donde la cinética de secreción indica que conforme aumenta el tiempo de incubación con colágena el reconocimiento por el anticuerpo disminuye. Alternativamente, se piensa que el aumento de reconocimiento entre 3h y 6h de incubación con colágena, nos sugiere la

existencia de un proceso de síntesis de proteínas. Esto se correlacionó con los resultados obtenidos por los ensayos de inmunotransferencia que revelaron el enriquecimiento de por lo menos 5 bandas de proteína reconocidas por el anticuerpo anti-GED durante el proceso de activación de la secreción. Este aumento fué evidente hasta las 6 h, ya que a las 15 h se mantuvo un patrón de bandeo similar al de las células no activadas.

Las características del proceso de secreción se resume de la manera siguiente:

a) Es un proceso regulado, esto es porque necesita de un estímulo para la aparición progresiva de los gránulos, así como una liberación de éstos al medio extracelular, lo que ésta correlacionado con el tiempo de activación.

b) Durante el proceso de secreción de este parásito es evidente la capacidad de almacenamiento de los productos de secreción en el citoplasma, localizándose en los gránulos en proporción al tiempo de activación.

c) Existe la liberación al medio extracelular de estos gránulos de secreción.

d) Probablemente durante la secreción exista una coordinación de los organelos similares a RE y aparato de Golgi, esto se detectó por medio del rastreo de los productos de secreción durante la activación.

e) Se sugiere un probable mecanismo de síntesis y/o maduración de los productos de secreción de los GED durante la cinética de secreción en este parásito.

A continuación se muestra un modelo de la secreción de este protozoario.

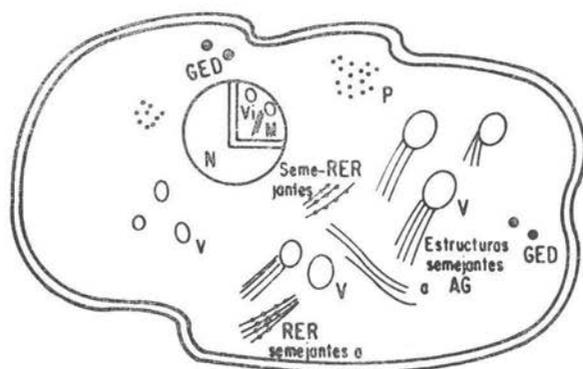


FIGURA 15 (A)

Trofozoitos de *E. histolytica* normales. En este modelo se trata de representar las estructuras observadas por estudios de ultraestructura con ME, donde cada organelo se representa con una abreviatura.

N=núcleo, P=polirribosomas, V=vesícula, AG=aparato de Golgi, RER=retículo endoplásmico rugoso, M=microtúbulos, Vi=vesículas intranucleares, GED=gránulos electrodensos.

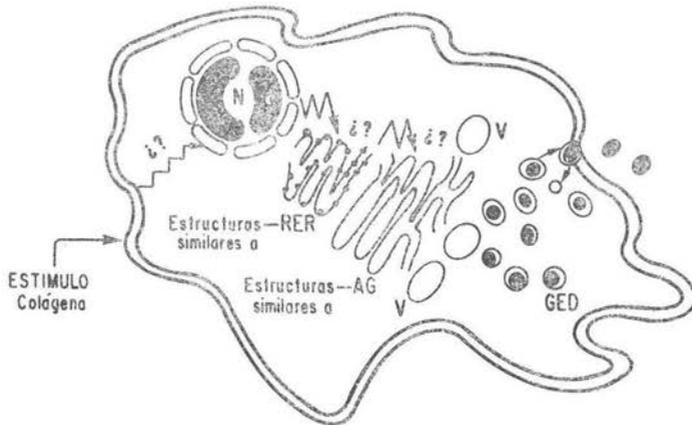


FIGURA 15 (B)

Modelo hipotético del proceso de secreción de trofozoítos de *E. histolytica*. El modelo representa la secuencia de eventos que podría ocurrir durante la secreción en trofozoítos activados por 6h de incubación con colágena tipo I. El proceso da inicio cuando la célula es estimulada por la colágena, enseguida esta información es probablemente trasladada al núcleo, manifestándose este evento en la condensación y descondensación de la cromatina nuclear de la ameba. Posteriormente al estímulo ocurre la síntesis de las proteínas de secreción y su procesamiento a través de los organelos implicados en el proceso de secreción (RER y AG). Después de 6h de activación estos productos almacenados en los gránulos de secreción (GED) aparecen en mayor cantidad en todo el citoplasma para luego finalmente fusionarse a la membrana plasmática y liberar a los GED. En observaciones realizadas por MET se apreció que los gránulos en su mayoría carecen de membrana, lo cual nos indicaría una posible fusión membrana-membrana, (tanto del gránulo como de la célula) concluyendo con el proceso de exocitosis de los productos secretores de la ameba activada.

N=núcleo, C=cromatina condensada, RER=retículo endoplásmico rugoso, AG=aparato de Golgi, V=vesícula, GED=gránulos electrodensos.

En lo que concierne a los resultados encontrados en el núcleo, se piensa que existe una sincronización de la división celular durante la activación de la secreción. Esto es inferido de los resultados obtenidos por Solís (1985), donde muestra 4 estadios de división nuclear de este parásito en cultivos sincronizados con colchicina. Las cuatro etapas que comprende dicho proceso abarcan la condensación de la cromatina, la cual en etapas iniciales se encuentra inmersa en todo el citoplasma. Conforme aumenta el tiempo de la división en el núcleo ocurre, una polarización de esta cromatina, para luego distribuirse de manera homogénea a cada uno de los núcleos hijos. La figura (16), muestra la secuencia de los eventos.

Los resultados indican que cuando la célula es activada para la secreción ocurre una sincronización de la condensación y descondensación de la cromatina dentro del núcleo, lo cual probablemente sugiere que la colágena estaría influenciando el proceso de transcripción en etapas de activación para la secreción; siendo un cultivo de crecimiento heterogéneo, es decir, que las células se encuentran en diferentes etapas de crecimiento celular, la colágena resultó ser un posible estímulo que sincroniza el crecimiento de dicho cultivo.

En resumen:

A) El estímulo de la colágena induce un proceso de sincronización, durante la división nuclear, en trofozoítos activados para la secreción.

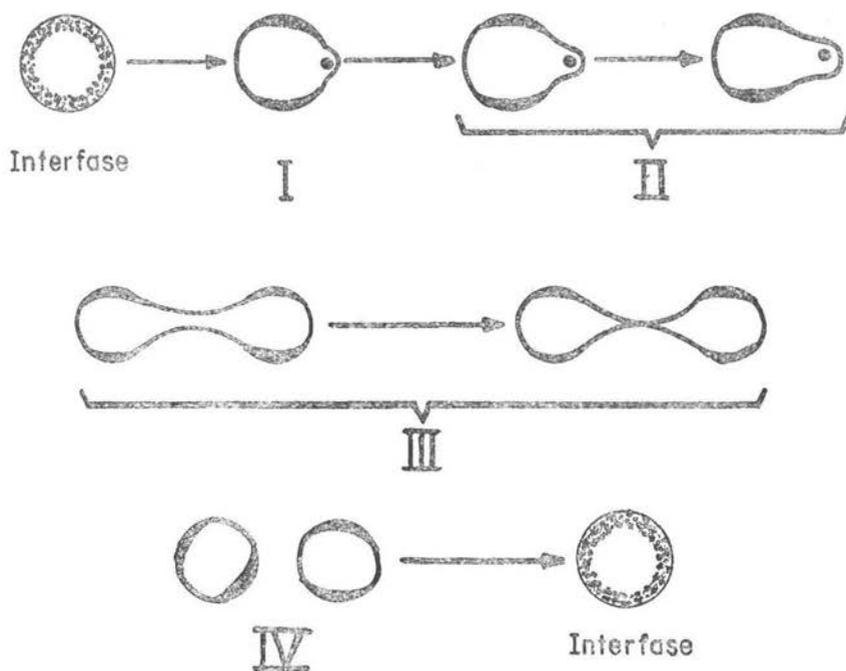


FIGURA 16

Modelo de la división nuclear. En el modelo se muestra un núcleo que realiza un ciclo de división mitótico. I.- primera fase, donde se muestra la esferúla yuxtannuclear; II.- la yema empieza a crecer; la condensación periférica se distribuye entre ambos núcleos; III.- fase en la cual los núcleos empiezan a separarse, y IV.- se muestra la interfase de los núcleos. "Tomado de Solís, 1986 en Transformación genética y división nuclear en *Entamoeba histolytica*".

B) La descondensación de la cromatina durante el proceso de secreción (principalmente a las 6 horas de activación) y su probable condensación (a las 15 horas de activación) sugieren un evento de transcripción coordinado por el estímulo de la colágena durante este proceso.

C) El número de núcleos que presentan marca fluorescente, se correlacionan con alguna de las fases de la división nuclear. Muy probablemente, a las 15 horas de activación las células presentan mayor número de núcleos marcados por que quizá es en esta fase cuando se dividen de manera más activa.

IX) CONCLUSIONES

Se puede concluir que el proceso de secreción de este parásito, cuando es activado con colágena tipo I, obedece a la ruta regulada y que durante este proceso ocurre un mecanismo de maduración y/o síntesis de proteínas. Así mismo se sugiere que el estímulo provocado por la colágena tipo I es enviado al núcleo celular como una señal específica que da como consecuencia la reorganización de la cromatina condensada o descondensada. Hablamos de señal específica ya que otros tipos de colágena como son la de tipo III y la de membrana basal no desencadenan el mismo tipo de secreción (comunicación personal: Dra. M. L. Muñoz). Por último cabe señalar que la secreción de estos GED está en estrecha relación con el proceso de invasión de los tejidos del hospedero por el trofozoito.

X) BIBLIOGRAFIA

Adams, E.B. y Mac Lead, I.N. 1977a. Invasive amebiasis I. Amebic dysentery and its complications. *Medicine* 56:315.

Adams, E.B. y Mac Lead, I.N. 1977b. Invasive amebiasis II. Amebic liver abscess and its complications. *Medicine* 56:325.

Adeyemo, A.O. y Aderounmu, A. 1984. Intrathoracic complications of amoebic liver abscess. *J. Roy. Soc. Med.* 77:17.

Aikat, B.K. y Bhusnurmooth, S.R., Pai, A.K. 1979. The pathology and pathogenesis of fatal hepatic amoebiasis a study based on 79 autopsy cases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73:188.

Albach, R.A., Booden, T., Boonlayangor, P. y Downing, S.W. 1977. Entamoeba histolytica: autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. *Exp. Parasitol.* 42,248-259.

Alvarez-Alva, R. y de la Loza-Saldivar, A. 1971. Frecuencia del absceso hepático amibiano en hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social de la Rep. Mex. *Arch. Invest. Med. (Mex)* 2 (suppl 1): 327-332.

Banerjee, A.K., Bhatnagar, R.K. y Bhusnurmooth, S.R. 1983. Secondary cerebral amoebiasis. *Trop. Med.* 35:333.

Bayer, E.A., Wilchek, M. y Skutelsky, E. 1976. Affinity cytochemistry the localization of lectin and antibody receptors on erythrocytes via the avidin-biotin complex. *FEBS Lett* 68,240-244.

Brandt, H. y Pérez-Tamayo, R. 1970. Pathology of human amoebiasis. *Human Pathology* 1:351.

Calderón, J., Muñoz, M.L. y Acosta, H.M. 1980. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in Entamoeba histolytica. *J. Exp. Med.* 51,184-193.

Carne, T. y Sheele, G. 1984. Role of Presecretory Proteins in the Secretory Process. In *cell Biology of the Secretory Process*. Karger, Basel. 1984. Edit. M Cantin Montreal.

Castro, H.E. 1974. Anatomic and pathological findings in amoebiasis report of 320 case, in Padilla y Padilla G.M. (eds): *Amoebiasis in Man*. Springfield, Ill, CC Thomas, 4-16.

Chalet, L. y Wolf, F.J. 1964. The properties of Streptavidin a Biotin-binding Protein Produced by

Streptomyces. Arch. Biochem. and Bioph. 106,1-5.

Coons, A.H., Creech, H.J. y Jones, R.N. 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 47, 200-202.

Crooks, J.E. 1978. "The Spectrum in Chemistry". Academic Press. London, New York and San Francisco.

Diamond, 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.

Douglas, E.Ch. y Williams, J.A. 1978. Intracellular divalent cation release in pancreatic acinar cell during stimulus-secretion coupling. The J. of Cell Biology 76,386-399.

Eldson-Dew, R. 1971. Amebiasis as a world problem. Bull N.Y. Acad. Med. 47,438-47.

Goding, J.W. 1983. Monoclonal Antibody: Principles and Practice, Academic Press London, New York and Toronto Montreal.

González-Robles, A. y Martínez-Palomo, A. 1983. Scanning Electron Microscopy of attached trophozoites of pathogenic Entamoeba histolytica. J. Protozool. 30:4 692-700.

Green, N.H. 1975. Avidin. Adv. Prot. Res. 29,85-133.

Gutierrez, G., Ludlow, A., Espinoza, G., Herrera, S., Muñoz, O., Raltoni, N. y Sepúlveda, B. 1976. National serologic survey II Search for antibodies against Entamoeba histolytica in Mexico. In Sepúlveda B, Diamond LS, eds. Proceedings of the international Conference on Amoebiasis. IMSS Mexico, 609-18.

Halvorsen, O. 1976. Negative interaction amongst parasites. En: Ecological Aspects of Parasitology. Edited by CR Kennedy. North Holland Amsterdam, 23-34.

Hans-Peter, H. 1986. Immunoblotting with monoclonal antibodies: Importance of the blocking solution. Analytical Biochemistry. 159,386-389.

Harder, L. y Rosal, A. 1975. Chronic non-dysenteric intestinal amoebiasis a review of 159 cases. JPMA 25:75.

Heggeness, M.H. 1977. Avidin binds to condensed chromatin. Stain. Technol. 452, 165-169.

Jarumilinta, R. y Kradolfer, F. 1962. The toxic effect of Entamoeba histolytica on Leukocytes. Ann. Trop. Med.

Parasitol. 58:375.

Jarumilinta, R. y Macgrait, B.G. 1969. Enzymes of Entamoeba histolytica. Bull WHO 41, 269-276.

Jimenez, F. 1981. Pathology of amebiasis. Bull. N.Y. Acad. Med. 97:217.

Juniper, K. 1978. Amoebiasis. Clin Gastroenterol. 7:1,3-30.

Kappor, O.P. y Shah, N.A. 198 . Pericardial amebiasis following amoebic liver abscess of the left lobe. J. Trop. Med. Hyg. 75:7.

Katzentein, D., Rickerson, V. y Braude, A. 1982. New concepts of amebic liver abscess derived from hematripimaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in Sn. Diego. Medicine 61:237.

Kelly, R.B. 1985. Patways of protein secretion in eukaryotes. Science 230, 25-32.

Krupp, R.B. 1977. Immunity of amoebic infection In S. Cohen and EH Sadun (ed). Immunology of parasitic infections. Blackwell Oxford.

Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-85.

Lombardo, L., Alonso, P. y Saez-Arroyo, L. 1964. Cerebral amebiasis report of 17 cases. J. Neurosurg 21:704.

Loomis, H.R., Britt, J.B., Gendron, Jr. A.P., H.J Holshumand, E.B. y Howard. 1983. Hepatic and gastric amebiasis in black and white colobus monkeys. J. Am. Vet. Med. Asoc. 183, 1188-1191.

Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr y L.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biol. Chem. 193, 265-275.

Luvano, F.M., Mitshali, B. y Baker, L. 1982. Toxic dilation complicating fulminant amoebic colitis. Br. J. Surg. 6:956.

Lynn, B.T. y Kelly, A.B. 1987. Constitutive and regulated secretion of proteins. Ann. Rev. Cell. Biol. 3, 243-293.

McLaughlin, J. y Aley, S. 1985. The biochemistry and functional Morphology of Entamoeba. J. Protozool. 32:2.

Marr, J.S. 1981. Amebiasis in New York City: a changing pattern of transmission. Bull. N.Y. Academic. Med.; 57, 188-

200.

Martínez, H.A. 1979. Inmunohistoquímica en Microscopía Electrónica. Investigación y Ciencia. 102-108.

Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. y De la Torre M. 1973. Selective agglutination of pathogenic strains of Entamoeba histolytica induced Con A. Nature New. Biol. 245.

Martínez-Palomo, A. 1982. The Biology of Entamoeba histolytica. Ed I. New York, John Wiley and Sons.

Martínez-Palomo, A. y Martínez-Baez, M. 1983. Selective Primary Health Care. Strategies for control of Disease in the developing world X Amoebiasis. Rev. Inf. Dis. 5:6, 1093-1102.

Martínez-Palomo, A., Meza I., Chávez B., Rosales-Encina J.L., Muñoz M.L., González-Robles A. y Rojkind M. 1987. Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozool. Infections. Editado por K.P. Chang y D. Snary. Berlin Heidelberg pp:371-376.

Minor, R.R. 1980. Collagen metabolism. Am. J. Pathol. 98: 227.

Moss, D.M. y Matews, H.M. 1987. A fast electrophoretic isoenzyme technique for the identification of invasive and no invasive Entamoeba histolytica and Entamoeba like organisms. J. Protozool. 34, 253-255.

Muñoz, M.M.L. 1981. Caracterización de la actividad colagenolítica de Entamoeba histolytica. Trabajo de Investigación para obtener el grado de Doctor en Ciencias en la especialidad de Biología Celular. Dpto. de Biol. Celular. CINVESTAV-IPN.

Muñoz, M.M.L., Calderón, J. y Rojkind, M. 1982. The collagenase of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 135, 42-51.

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

Nanda, R., Baveja, V. y Anand, B.S. 1979. Entamoeba histolytica cyst passers: Clinical features and outcome in untreated subjects. Lancet 2:301.

Ortiz-Ortiz, L., Ximénez, L., Mendoza, F., Michalar, C., Melemdro, E.I. y Oliva, A. 1986. Entamoeba histolytica: Specific antigen reorganized by a monoclonal antibody. Ex. Parasitol. 61, 390-397.

Pan, C.T. y Geiman, G. 1955. Comparative studies of intestinal amebae I. Distributions and cyclic changes of the nucleic acids in Entamoeba histolytica y Entamoeba coli. Amer. J. of Hyg. 62:66.

Perez-Tamayo, R y Brandt, H. 1971. Amoebiasis. En Marcial Rojas R A (ed). Pathology of Protozoology and Helminthic Diseases. Baltimore U.S.A., Williams & Wilkins.

Price, P.W. 1977. General concepts on the evolutionary biology of parasites. Evolution 31, 405-420.

Price, P.W. 1980. Evolutionary Biology of parasites in Introduction The parasites lot in evolutionary Biology. Princeton University. U.S.A. pp 1-43.

Proctor, E.M. y Gregory, M.A. 1972. The ultrastructure of axenically cultivated trophozoites of Entamoeba histolytica with particular reference to an observed variation in structural pattern. 66:3, 335-338.

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

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

Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R.L. y Long-King, S.A. 1985. Effect of calcium and phospholipase A antagonist on the pathogenicity of Entamoeba histolytica. J. Infect. Disc. 152, 542-549.

Ravdin, J.I. 1986. Pathogenesis of disease with Entamoeba histolytica. Studies of adherence toxins and contact dependent cytolysis. Infect. Disc. 8, 247-260.

Riggs, J.L., Serwald, R.J., Burckhalter, J.H., Downes, C.M. y Metcalf, T.G. 1958. Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. Am. J. Pathol. 34, 1084-1098.

Rough, J. 1969. World Health Organization. Amoebiasis. Report of an WHO Expert Committee. WHO The Rep. Ser. 421, 1-52.

Rojkind, M. y Ponce-Noyola, P. 1982. The extracellular matrix of the liver collagen. Rel. Res. 2, 151-175.

Rosenvaum, R.M. y Wittner, M. 1970. Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of Entamoeba histolytica with particular reference to helical bodies. The Journal of

Cell Biology. 45, 367-382.

Salata, R.A. y Ravdin, J.I.: 1985. Interaction of human leukocytes with Entamoeba histolytica: killing of virulent amebas by the activated macrophages. J. Clin. Invest. 76, 491-499.

Salata, R.A. y Ravdin, J.I. 1986. The interaction of human neutrophils and Entamoeba histolytica trophozoites increases cytopathogenicity for liver cell monolayers. J. Infect. Dis. 154, 19-25.

Salata, R.A., Cox, J.G. y Ravdin, J.I. 1987. The interaction of human T lymphocytes. Parasite Immunol 9, 249-252.

Solís, M.J.F. 1986. Transformación genética y división nuclear en Entamoeba histolytica. Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencias en la especialidad de genética. CINVESTAV-IPN.

Skutelsky, E., Goyal, V. y Alroy, J. 1987. The use of avidin-gold complex for light microscopic localization of lectin receptors. Histochemistry 86, 291-295.

Stamm, W.O., Ashley, M.J., Bell, K. 1976. The value of amoebic serology in an area of low endemicity. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 49-53.

Strachmann, W.D., Chiodoni, P.L., Spice, W.M., Mody, A.H., Achers, J.P. 1986. Immunological differentiation of pathogenic and non pathogenic isoetes of Entamoeba histolytica. Lancet 12, 561-562.

Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya, V. y Martínez-Palomo, A. 1984. Cellular basis of experimental amoebic liver abscess formation. Am. J. Pathol. 117:81.

Voller, A., Bidwell, D.E. y Bartlett, A. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). DYNATECH LABORATORIES INC.

Yee, Ch. y Maegraith, B.G. 1970. Electron microscopy of an axenic strain Entamoeba histolytica. Annals. of Trop. Med. Paras. 64:3, 293-298.

Young, D-E., y Cohn, J. 1985. Molecular Mechanisms of cytotoxicity mediated by Entamoeba histolytica: Characterization of a Pore-forming protein (PFP). 29, 299-308