

60
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



CARACTERIZACIÓN INMUNOBIOQUÍMICA DE UN
ANTÍGENO DE SUPERFICIE DE *Entamoeba histolytica*
QUE PARTICIPA EN EL CONTACTO CON LA
CELULA BLANCO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
J O B G A R C I A L I E V A N A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.,

1994



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.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realiz 6 el pasante _____

GARCIA LIEVANA JOB

con número de cuenta 8336865-3 con el título: _____

"Caracterización inmunobiológica de un antígeno de
superficie de Entamoeba histolytica que participa
en el contacto con la célula blanco".

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de
BIOLOGO.

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

Dra. MARIA ESTHER OROZCO OROZCO

Director de Tesis

Dra. SARA FRIAS VAZQUEZ

M. en I.B.B. GABRIELA GARCIA PEREZ

Q.F.B. FERNANDO RAMOS REYES

Suplente

Dr. JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

Suplente

FIRMA

Ciudad Universitaria, D.F., a 29de Junio de 1994.

Dedico esta Tesis

A mis padres

CAROLINA LIEVANA SANTIAGO

y

ADAN A. GARCIA ESPINOSA

**por su infinito apoyo económico y moral, por su amor y comprensión,
pero sobre todo, por brindarme la oportunidad de tener una educación.**

Los amo. GRACIAS.

A mis hermanos

ADAN y ARQUIMEDES

**por su constante apoyo y motivación, por representar para mí
un ejemplo de superación que espero imitar.**

Gracias.

A TOÑITA

con todo mi amor.

Por lo maravilloso que ha sido compartir la vida a tu lado.

Gracias.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección general de la Dra. María Esther Orozco Orozco.



CINVESTAV-IPN

Este trabajo forma parte del proyecto "*Entamoeba histolytica*: diferencias genotípicas y fenotípicas entre trofozoitos patógenos y no patógenos. Su utilidad en la epidemiología molecular", subvencionado económicamente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México), la Agencia Internacional de Energía Atómica (Austria) y el Instituto Médico Howard Hughes (E.U.A.).

Agradezco de manera especial el apoyo económico que durante una parte de mi trabajo recibí de parte del CINVESTAV-IPN, a través del apoyo a proyectos específicos.

La biología ocupa, entre las ciencias, un lugar a la vez marginal y central. Marginal en cuanto que el mundo viviente no constituye más que una parte ínfima y muy "especial" del universo conocido, de suerte que el estudio de los seres vivos no parece poder lograr jamás la revelación de unas leyes generales, aplicables fuera de la biósfera. Pero si la ambición última de la ciencia entera es fundamentalmente, como creo, dilucidar la relación del hombre con el universo, entonces es justo reconocer a la biología un lugar central puesto que es, entre todas las disciplinas la que intenta ir más directamente al centro de los problemas que se deben de haber resuelto antes de proponer el de la "naturaleza humana", en unos términos que no sean metafísicos.

Así, la biología es, para el hombre, la más significativa de todas las ciencias; es la que ha contribuido ya, sin lugar a duda, más que ninguna otra, a la formación del pensamiento moderno, profundamente trastornado y definitivamente marcado en todos los terrenos: filosófico, religioso y político, por el advenimiento de la teoría de la evolución.

Jacques Monod

El azar y la necesidad

A ELLOS Y SUS VIDAS



CONTENIDO

INDICE	I
Lista de Abreviaturas	V
Lista de Figuras	VII
Lista de Tablas	VIII
RESUMEN	IX
INTRODUCCION	1
AMIBIASIS	2
1. Antecedentes históricos	2
2. Epidemiología	4
2.1. <i>E. histolytica</i> ¿1 ó 2 especies?	5
3. Generalidades de <i>E. histolytica</i>	6
3.1. Filogenia y clasificación	7
3.2. Ciclo de vida	7
3.3. Factores involucrados en la virulencia amibiana	9
3.3.1. Factores del huésped	9
3.3.2. Factores del microambiente	12
3.3.3. Factores propios del parásito	13
3.3.3.1. Adhesión	13
3.3.3.2. Citólisis dependiente de contacto	14
3.3.3.3. Fagocitosis	15
3.3.4. Evasión de la respuesta inmune	16
4. Antecedentes directos	17
4.1. Importancia de la adhesión en los microorganismos	17
4.2. Proteínas amibianas que participan en la relación parásito-célula blanco	18
4.3. La proteína de 24 kDa (p24)	20
4.4. Anticuerpos monoclonales: una herramienta importante en el estudio de los antígenos de los parásitos	22
TEORIA DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	
1. La teoría de la selección clonal	25
2. Estructura de los anticuerpos	26
3. Control de la respuesta inmune	27
4. Mieloma	27
5. Fusión de las células y selección de los híbridos	30
5.1. Híbridomas	31
6. Diferencias entre serología monoclonal y convencional	36
VACUNAS	
1. Producción de vacunas	37
2. Inmunoprofilaxia de la amibiasis	38

II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
OBJETIVOS	42
MATERIALES Y METODOS	43
1. Cultivo de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> de la cepa HM1:IMSS	43
2. Extracción de proteínas amebianas totales	44
2.1. Método directo empleando el inhibidor de proteasas <i>p</i> -hidroximercuribenzoato (Método 1)	44
2.2. Método de extracción con MgCl ₂ -ácido acético empleando el inhibidor de proteasas <i>N</i> -etil-maleimida (Método 2)	44
3. Cuantificación de proteínas empleando el método de Lowry	45
4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturilizantes y reductoras (PAGE-SDS)	46
5. Electroforesis bi-dimensional en geles de poliacrilamida	47
6. Tinciones de los geles de poliacrilamida	49
6.1. Tinción con azul de Coomassie	49
6.2. Tinción de PAS para carbohidratos	50
7. Electroclución de proteínas a partir de geles de poliacrilamida	51
8. Inmunelectrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa (<i>Western blot</i>)	52
8.1. Con un segundo anticuerpo marcado	52
8.2. Con una lectina marcada	55
9. Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-amiba	56
10. Inmunización de ratones de la cepa BALB/c con la proteína de 24 kDa para la obtención de células de bazo para fusión celular	57
10.1. Aislamiento de la proteína de 24 kDa	57
10.2. Cuantificación	57
10.3. Esquema de inmunización	58
11. Extracción de macrófagos de peritoneo de ratón como células alimentadoras de mieloma e hibridomas	60
12. Cultivo de células de mieloma de la línea P3-X63-Ag8. 653	61
12.1. Curva de crecimiento y determinación de la fase logarítmica	61
12.2. Prueba de viabilidad por exclusión con azul tripano	62
13. Fusión celular entre células de mieloma y células de bazo inmune	63
14. Cultivo y clonación de hibridomas	65
15. Congelación y descongelación de hibridomas	66
16. Obtención a gran escala de anticuerpos monoclonales	67
16.1. Crecimiento en masa de hibridomas	67
16.2. Inducción de tumores en ratón	68
17. Determinación del isotipo de los anticuerpos	69
18. Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio	70

RESULTADOS	71
1. Caracterización inmunobioquímica de la p24	71
1.1. Obtención de proteínas totales de <i>E. histolytica</i> y reconocimiento por anticuerpos policlonales anti-p24	71
1.2. Determinación del número de proteínas con peso de 24 kDa por electroforesis en geles bi-dimensionales	72
1.3. Detección de carbohidratos en la p24	73
1.3.1. Tinción de PAS	73
1.3.2. Reconocimiento por una lectina	80
2. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-p24	80
2.1. Obtención de la p24	80
2.2. Esquema de inmunización de la p24	81
2.3. Determinación del título de anticuerpos	81
2.3.1. ELISA	88
2.3.2. <i>Western blot</i>	89
2.4. Determinación de la fase logarítmica de crecimiento de la línea de mieloma	89
2.5. Fusión celular	95
2.5.1. Eficiencia de fusión	95
2.5.2. Eficiencia de clonación	96
3. Caracterización de los anticuerpos monoclonales	97
3.1. Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales	97
3.2. Reconocimiento y título	102
DISCUSION	109
1. Caracterización preliminar de la p24	109
2. Anticuerpos monoclonales contra la p24	113
3. Perspectivas	117
CONCLUSIONES	119
REFERENCIAS	121
APENDICE	139
AGRADECIMIENTOS	141

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina bovina sérica (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CHO	Línea celular aislada de ovario de hámster (<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>)
Con A	Concanavalina A
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
HAT	Hipoxantina Aminopterina Timidina
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>)
HT	Hipoxantina Timidina
Ig	Inmunoglobulina
kDa	Peso molecular en kilodaltones
MDCK	Línea celular aislada de riñón de perro (<i>Madin Darby Canine Kidney cells</i>)
NC	Nitrocelulosa
NEM	<i>N</i> -etil-maleimida
NP-40	Detergente no iónico (<i>Nonidet-P40</i>)

PAS	Reactivo de Schiff-ácido peryódico (<i>Periodic acid, Schiff's reagent</i>)
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (<i>Polyacrilamide gel electrophoresis-SDS</i>)
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PEG	Polietilenglicol
<i>p</i> -HMB	para-hidroximercuribenzoato
RNA	Acido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> tetrametilendiamina
TYI-S-33	Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero para cultivo axénico de <i>E. histolytica</i>
WGA	Aglutinina de germen de trigo (<i>Wheat germ agglutinin</i>)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.
- Figura 2. La teoría de la selección clonal de la inmunidad.
- Figura 3. Sistema de selección con el medio HAT.
- Figura 4. Procedimiento para la obtención de anticuerpos monoclonales.
- Figura 5. Reconocimiento de la proteína de 24 kDa por anticuerpos policlonales anti-p24.
- Figura 6. Reconocimiento de anticuerpos policlonales anti-p24 en geles bi-dimensionales.
- Figura 7. Tinción de PAS.
- Figura 8. Reconocimiento de la p24 por una lectina.
- Figura 9. Obtención de la p24.
- Figura 10. Análisis densitométrico de las proteínas amibianas totales.
- Figura 11. Reconocimiento de los sueros de ratón inmunizados con la p24 por inmunoelectrotransferencia.
- Figura 12. Curva de crecimiento. Línea celular de mieloma.
- Figura 13. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-p24.
- Figura 14. *Pedigree* de los tres hibridomas estables.
- Figura 15. Reconocimiento de los anticuerpos monoclonales sobre las proteínas totales de *E. histolytica*.
- Figura 16. Reconocimiento del anticuerpo monoclonal D5-4-F7-A10 en un gel de 2-D transferido a nitrocelulosa.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Parásitos protozoarios más importantes.
- Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Entamoeba histolytica*.
- Tabla 3. Estudios con proteínas de *Entamoeba histolytica* cercanas a 24 kDa.
- Tabla 4. Anticuerpos monoclonales contra *Entamoeba histolytica*.
- Tabla 5. Titulación de los sueros de ratón por ELISA.
- Tabla 6. Eficiencia de fusión en la obtención de anticuerpos monoclonales.
- Tabla 7. Eficiencia de clonación de hibridomas.
- Tabla 8. Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales.

RESUMEN

En este trabajo nos propusimos como objetivo principal obtener anticuerpos monoclonales contra una proteína de 24 kDa del parásito *Entamoeba histolytica*, agente causal de la amibiasis intestinal humana.

La adhesión del trofozoíto de *E. histolytica* a su célula blanco es el paso inicial en su mecanismo agresor y en la colonización e invasión de los tejidos. El estudio de los antígenos de superficie involucrados en la relación parásito-célula blanco es importante para el desarrollo de técnicas de identificación, diagnóstico y en el diseño de métodos que conduzcan al desarrollo de vacunas que protejan efectivamente a las poblaciones afectadas por este microorganismo (≈ 10 % de la población mundial).

La proteína de 24 kDa (p24) se adhiere a eritrocitos humanos, sus niveles de expresión se encuentran alterados en cepas no patógenas del parásito, y no es reconocida por anticuerpos policlonales anti-p24 en mutantes deficientes en adhesión, lo que nos indica que muy probablemente tiene un papel importante en la relación parásito-célula blanco.

La técnica para producir anticuerpos monoclonales constituye una herramienta útil en la caracterización de los antígenos de los parásitos y ha permitido profundizar en el conocimiento de sus funciones.

La p24 se caracterizó inicialmente en geles de PAGE-SDS uni y bi-dimensionales y en ensayos de inmunoelectrotransferencia para determinar el número de proteínas de ese peso y para definir si es una glicoproteína.

Para obtener anticuerpos monoclonales contra la p24, se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c con la p24 obtenida a partir de geles de poliacrilamida. Las células de bazo inmune se fusionaron con células de mieloma de la línea P3-X63-Ag8.653 y los híbridos se seleccionaron en el sistema HAT. Se obtuvieron 11 hibridomas positivos anti-p24, algunos se clonaron dos veces por la técnica de dilución limitante y se caracterizaron 3 de ellos. A los anticuerpos monoclonales se les determinó su isotipo y se purificaron parcialmente.

Todos los anticuerpos monoclonales reconocieron a la p24 y dos de ellos tienen una reacción cruzada con una proteína de 32 kDa.

REFERENCES

1. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part I. Time delay steering and beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 41-47, 1996.
2. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part II. Adaptive processing," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 48-57, 1996.
3. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part III. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 58-65, 1996.
4. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part IV. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 66-73, 1996.
5. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part V. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 74-81, 1996.
6. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part VI. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 82-89, 1996.
7. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part VII. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 90-97, 1996.
8. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part VIII. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 98-105, 1996.
9. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part IX. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 106-113, 1996.
10. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part X. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 114-121, 1996.
11. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XI. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 122-129, 1996.
12. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XII. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 130-137, 1996.
13. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XIII. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 138-145, 1996.
14. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XIV. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 146-153, 1996.
15. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XV. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 154-161, 1996.
16. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XVI. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 162-169, 1996.
17. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XVII. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 170-177, 1996.
18. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XVIII. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 178-185, 1996.
19. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XIX. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 186-193, 1996.
20. J. H. Van Veen, "Signal processing in microphone arrays: Part XX. Adaptive beamforming," *IEEE Signal Processing Magazine*, vol. 13, pp. 194-201, 1996.

INTRODUCCION

En todos los países en vías de desarrollo -tanto en regiones tropicales como subtropicales- las condiciones socioeconómicas y los estándares de sanidad e higiene son muy bajos. En consecuencia, es común la infección humana con una gran variedad de parásitos, entre los que se encuentran los intestinales.

En estos países, la población sufre de desnutrición y de una inmunidad deficiente, éstos constituyen factores de predisposición muy importantes y estrechamente relacionados entre sí, y son probablemente mucho más importantes en el contexto de las infecciones del tracto gastrointestinal por protozoarios, que por helmintos (Cook, 1990).

La Tabla 1 resume los parásitos protozoarios intestinales más importantes. Como se puede observar, son encabezados por *Entamoeba histolytica* (Cook, 1980; Martínez-Palomo, 1987; Ravdin, 1988).

Tabla 1. Parásitos protozoarios más importantes.

Lumen	Patógenos	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Balantidium coli</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium sp</i>
	No patógenos	<i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Blastocystis hominis</i> <i>Entamoeba coli</i> <i>Entamoeba hartmanii</i> <i>Iodamoeba butschlii</i> <i>Endolimax nana</i> <i>Chilomastix mesnili</i> <i>Pentatrichomonas hominis</i> <i>Retortamonas intestinalis</i>
Pared intestinal (No luminal)		<i>Enteromonas hominis</i>

AMIBIASIS

La amibiasis es la infección humana provocada por *E. histolytica*. Aunque es una enfermedad de distribución mundial, la magnitud global de la amibiasis es difícil de establecer; en 1981, se estimó que 480 millones de personas en el mundo, estaban infectadas con *E. histolytica*, de los cuales, 36 millones desarrollaron abscesos amibianos o colitis y al menos 40,000 murieron (Walsh, 1986). En términos numéricos, estos datos la convierten en la tercera infección parasitaria humana más importante, después de la malaria y la esquistosomiasis.

1. Antecedentes históricos.

La amibiasis ha existido probablemente desde que la especie humana se diferenció de sus predecesores inmediatos en el curso de la evolución. Se han encontrado escritos relacionados con los síntomas clásicos de la disentería, con probabilidad amibiana, en documentos muy antiguos, desde 3,000 años antes de nuestra era y en trabajos de Hipócrates del siglo V a.C. Los médicos romanos y los individuos que practicaban el arte de curar durante la Edad Media también dejaron evidencias de su conocimiento de la disentería (Martínez-Báez, 1989). Sin embargo, no fue sino hasta la segunda mitad del siglo XIX cuando se analizó un caso de disentería en el que se detectaron amibas de una especie desconocida, en las heces de un paciente.

En 1875, el Dr. Fedor Aleksandrovich Lesh (Lösch) asoció por primera vez la disentería con un organismo parásito al hombre al estudiar a un paciente originario de Arcángel (San Petersburgo, Rusia), que presentaba síntomas de disentería crónica. Lesh siguió atentamente el curso de la enfermedad y estableció la relación directa entre el número de amibas en las heces del paciente y la intensidad del cuadro clínico. Al realizar la necropsia de este paciente encontró cicatrices y úlceras en el ciego, principalmente. El examen histopatológico de estas úlceras reveló la presencia de amibas infiltradas en la submucosa. Lesh describió con detalle estas amibas, en cuyo citoplasma encontró eritrocitos, entre otros cuerpos ingeridos. Después de hacer comparaciones entre estas amibas y otras especies ya

conocidas, dedujo que se trataba de una nueva especie a la que denominó *Amoeba coli* (Martínez-Baez, 1989).

Además, con el fin de evidenciar la patogenicidad de las amibas, Lesh realizó algunos experimentos. Inoculó cuatro perros, por las vías bucal y rectal, con las heces del campesino de Arcángel, y después de algunos días observó que uno de los perros presentaba síntomas de disentería; pero, como este resultado no le pareció evidencia suficiente, nunca concluyó que estos parásitos constituyeran el agente causal de la enfermedad. Más tarde, Stephanos Kartulis en 1886, publicó sus observaciones sobre 150 casos de disentería, en la mayoría de los cuales encontró amibas como las descritas por Lesh, y afirmó por primera vez el papel etiológico de las amibas en la disentería. En el siguiente año, Robert Köch encontró amibas en los capilares hepáticos cercanos a los abscesos, con lo cual estableció que debía existir una relación etiológica entre la disentería y el absceso hepático.

En 1891, Councilman y Lafleur relataron minuciosamente el cuadro clínico de la amibiasis y de las lesiones encontradas en ella, así como una descripción detallada de las amibas causales denominadas por ellos *E. dysenteriae*. Crearon los términos "disentería amibiana", así como el de "absceso hepático amibiano" y sugirieron la presencia de una amiba no patogénica en el colon humano.

Posteriormente, en 1893 Quincke y Roos descubrieron la forma quística de la amiba y describieron el ciclo de vida de las amibas parásitas en el intestino humano. En 1903, Schaudinn mediante estudios estructurales distinguió las dos especies de amibas conocidas hasta entonces como parásitos del ser humano; a la patógena la llamó *E. histolytica* y a la no patógena *Entamoeba coli*. En 1904, Musgrave y Clegg crearon el término "amibiasis" para indicar la infección con *E. histolytica*, independientemente de que esta enfermedad esté acompañada o no de síntomas. Después, Walker y Sellards en 1913, demostraron la patogenicidad de *E. histolytica* y la inocuidad de *E. coli*. Enfatizaron también el papel importante de los quistes en la transmisión de la amibiasis, con lo que facilitaron el desarrollo de futuras medidas de prevención. Al estudiar la *E. histolytica*, los investigadores descubrieron otras especies y otros géneros que con frecuencia parasitan al hombre, por ejemplo, *E. gingivalis*, *E. coli*, *Iodamoeba butschlii*, *E. hartmanni*, *Endolimax nana*, etc.

Musgrave y Clegg lograron cultivar varias especies de amibas de vida libre en 1904,

INTRODUCCION

pero no fue sino hasta 1924 cuando Boeck y Drbohlav desarrollaron un medio de cultivo en el que las amibas parásitas podían crecer fácilmente; sin embargo, ese método requiere cultivar las amibas en presencia de bacterias. Finalmente, Diamond en 1961, elaboró un medio de cultivo que permite el cultivo del parásito, sin necesidad de asociarlo con otros microorganismos. Este medio axénico ha facilitado gran número de trabajos de investigación sobre cepas patógenas de *E. histolytica*, libres de toda contaminación (Martínez-Báez, 1989).

2. Epidemiología.

Aproximadamente, el 10% de la población mundial es portadora de *E. histolytica*, sin embargo, sólo un pequeño porcentaje sufre de la enfermedad. En 1984 se estimó que probablemente 500 millones de personas estaban infectadas con *E. histolytica* y que 40 millones desarrollaron colitis o abscesos extraintestinales (Walsh, 1988). La prevalencia de esta infección en los países industrializados ha disminuido con la urbanización y con mejores estándares de sanidad e higiene. Sin embargo, continúa siendo común en los países en vías de desarrollo (Ravdin, 1989) y en los turistas que viajan a estos países (de Lalla y col., 1988). En grupos de homosexuales, se han encontrado proporciones que se aproximan a las de las áreas endémicas (Phillips y col., 1981; Allason-Jones y col., 1986).

La forma infectante de *E. histolytica* son los quistes, permanecen viables e infectantes durante varios días en las heces y pueden sobrevivir en el ambiente hasta por ocho días a temperaturas entre 28 y 34°C y durante más de un mes a 10°C; también sobreviven infectantes en agua, agua de mar y suelos húmedos, dependiendo de la temperatura y hasta 45 minutos en la materia fecal depositada debajo de las uñas, aunque son destruidos por desecación en los primeros 10 minutos sobre la superficie de las manos (Muñoz, 1989). Las formas más frecuentes de transmisión son la contaminación de alimentos y la transmisión de persona a persona. El mayor riesgo está asociado con los portadores asintomáticos de quistes, especialmente si están dedicados al manejo y preparación de alimentos. La mayoría de los individuos que alojan al parásito son portadores sanos, que por día eliminan hasta 1.5×10^7 quistes en las heces (Muñoz, 1989).

El diagnóstico de la infección amibiana se basa en la localización de amibas en las heces o de anticuerpos específicos en el suero. Sin embargo, ambos métodos presentan

algunos problemas. Todas las técnicas para el examen de las heces son tediosas, tardan mucho tiempo, son caras y requieren de una gran habilidad en el uso del microscopio y en la identificación del parásito.

Se piensa que las consecuencias graves de la enfermedad son producidas por cepas patógenas, mientras que aquellas personas que portan cepas no patógenas presentan un bajo riesgo de desarrollar la enfermedad. Hasta el momento no existen métodos sencillos y rápidos para distinguir entre quistes de cepas patógenas y no patógenas si bien, exclusivamente durante la amibiasis invasiva se presentan trofozoítos móviles que contienen varios eritrocitos ingeridos (Walsh, 1988).

En México, la amibiasis es una enfermedad endémica y está considerada como un problema de salud pública, ya que se encuentra actualmente, entre una de las primeras diez causas de muerte. En 1984, 3.9 millones de mexicanos presentaron anticuerpos contra *E. histolytica* y de 5.5 a 7 millones presentaban síntomas moderados o severos de la enfermedad (Walsh, 1988). En la ciudad de México al menos el 15% de las hospitalizaciones de niños por diarrea son debidas a amibiasis (Gutiérrez-Trujillo, 1980). Se ha estimado que en el país existe una proporción de un paciente con amibiasis invasiva por cada 4 ó 5 portadores asintomáticos (Sepúlveda, 1980).

México es uno de los países más afectados por amibiasis invasora, a juzgar por la frecuencia y la gravedad de los abscesos hepáticos amibianos y, seguramente, no resulta raro que una de las cepas más virulentas que se conocen (la HM1:IMSS) haya sido aislada en nuestro país (Tsutsumi y col., 1992).

2.1. *E. histolytica* ¿1 ó 2 especies?

Una de las preguntas más importantes que han dominado durante mucho tiempo la investigación en amibiasis es saber cuál es la explicación al bajo número de individuos que desarrollan amibiasis invasiva, considerando que el 90% de los individuos infectados son portadores asintomáticos. En otros términos, si ese tipo de amiba, morfológicamente idéntica, que es la responsable de una infección aparentemente no patógena, debería ser tratada como una especie aparte, cuya característica principal es ser exclusivamente comensal. Si se llegase a conocer que esta amiba efectivamente es incapaz de producir los síntomas más graves de

INTRODUCCION

la enfermedad, las consecuencias serían de gran alcance para el diagnóstico y tratamiento de la amibiasis, principalmente en los portadores asintomáticos (Spice y Ackers, 1992).

Existen tres hipótesis que intentan explicar este fenómeno: 1) *E. histolytica* es una sola especie patógena que en los humanos produce lesiones que pueden o no dar lugar a síntomas clínicamente reconocibles; 2) *E. histolytica* es normalmente un comensal que reside en el colon humano y que por razones que todavía no se comprenden bien, es capaz de convertirse en un patógeno invasivo, y 3) *E. histolytica* está compuesta de dos especies morfológicamente idénticas, una patógena invasiva que presenta varios grados de virulencia y la otra una patógena no invasiva que tiene la capacidad de producir, a lo mucho, una erosión superficial de la mucosa intestinal (Diamond y Clark, 1993).

Algunos autores, como Sargeant (1992) y Clark y Diamond (1993) piensan que la tercera hipótesis es la que mejor explica el fenómeno, proponiendo una redescrición de la especie *E. histolytica* en dos especies: la no patógena como *E. dispar* y la patógena como *E. histolytica*. Sin embargo, otros grupos (Mirelman y col., 1986, 1993; Andrews y col., 1990; Vargas, 1994) presentan evidencias a favor de la interconvertibilidad de cepas no patógenas en patógenas, lo cual hace que la pregunta no tenga una respuesta todavía satisfactoria.

3. Generalidades de *E. histolytica*.

E. histolytica es, estructuralmente hablando, un eucarionte sencillo. Este organismo carece de mitocondrias, peroxisomas y de un aparato de Golgi bien desarrollado. Aparte del núcleo, su rasgo ultraestructural más conspicuo es la presencia de numerosas vacuolas digestivas, las cuales pueden llegar a ser bastante grandes (hasta 2 μm) (Bakker-Grunwald y Wöstmann, 1993). Las peculiaridades de *E. histolytica*, en cuanto a metabolismo, son la ausencia de citocromos y de un ciclo funcional de los ácidos tricarbóxicos, la presencia de piruvato citoplásmico: con ferredoxin-oxidoreductasa en vez del complejo de piruvato deshidrogenasa; la fosfofructuocinasa depende de pirofosfato más que de ATP y presenta una ausencia general de regulación alostérica en la glucólisis (Bakker-Grunwald y Wostmann, 1993).

3.1. Filogenia y clasificación.

E. histolytica pertenece al reino Protoctista, un grupo formado principalmente por linajes de microorganismos provenientes de los primeros eucariontes (Margulis y col., 1990). De acuerdo con algunos autores (Sogin, 1989; Kabnick y Peattie, 1991; Knoll, 1992), y con datos de filogenias basadas en comparación de secuencias de la subunidad pequeña del RNA ribosomal, *E. histolytica* pertenece a un linaje que, junto con los flagelados, divergió muy temprano dentro de la evolución de los eucariontes, solamente antecedido por los de *Microsporidia*, *Trichomonas* y *Giardia*. Debido a las características de la amiba, anteriormente citadas, se ha postulado que es probablemente uno de los organismos más primitivos que existen, un fósil metabólico. Incluso, se ha sugerido que *E. histolytica*, junto con *Giardia*, reúne muchas características que la colocan como probablemente el último ancestro común ("protoeucarionte") de todos los eucariontes con o sin mitocondrias (Cavalier-Smith, 1991; Bakker-Grunwald y Wostmann, 1993).

La clasificación taxonómica de *E. histolytica*, como la de otros protoctistas, presenta discrepancias entre autores, principalmente en los niveles de reino, phylum, subphylum y superclase. Recientemente, Cavalier-Smith (1993), propuso que los microorganismos eucariontes clasificados como protoctistas, deben ser considerados en nuevos reinos como el Archezoa y el Protozoa, debido principalmente a que el reino protoctista es excesivamente grande, con linajes independientes y sus límites con otros reinos no están bien definidos. Para este autor, *E. histolytica* debe ser considerada en el reino Protozoa. En cuanto al nivel de phylum, algunos autores proponen que pertenece al phylum protozoa (Barnes, 1984), para otros al sarcomastigophora (Levine y col., 1980; Despommier y Karapelou, 1987) y para otros al rhizopoda (Schuster, 1990). En lo que todos concuerdan es que pertenece a los llamados rhizopodos, cuyo rasgo principal es la presencia de pseudópodos en algún estadio de su ciclo de vida y a los entamoebidae, cuyos miembros son todos parásitos (Corliss, 1987). La Tabla 2 muestra la clasificación de *E. histolytica*, que propuso Schuster (1990).

3.2. Ciclo de vida.

En el ciclo de vida de *E. histolytica* se distinguen dos estadios principalmente: el quiste y el trofozoito (Fig. 1). El quiste debe ser ingerido para que el ciclo de vida continúe

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Entamoeba histolytica*.

Reino	Protoctista
Phylum	Rhizopoda
Clase	Lobosea
Subclase	Gymnamoebia
Orden	Amoebida
Suborden	Tubulina
Familia	Entamoebidae
Género	<i>Entamoeba</i>
Especie	<i>histolytica</i>

(Fig. 1·a). El quiste se caracteriza por ser pequeño, esférico, comunmente de 12 μm de diámetro, y está rodeado por una pared de quitina, lo que le confiere una gran resistencia. Cada quiste posee cuatro núcleos, cada uno de los cuales presenta un cariosoma central. La ruta de infección más usual es la oral: los quistes son ingeridos en agua o alimentos contaminados con materia fecal (Fig. 1·b) y viajan por el aparato digestivo hasta la región del ileon, donde se produce el desenquistamiento (Fig. 1·2) (Martínez-Palomo, 1982; Cook, 1990).

De cada quiste en proceso de desenquistamiento se origina un protoplasto desnudo tetranucleado. Cada uno de los núcleos sufre un proceso de división y el protoplasto se divide inmediatamente para originar ocho trofozoitos metaquisticos uninucleados (Fig. 1·2). Estos trofozoitos migran al ciego, donde se adhieren a la mucosa y sufren un proceso de maduración para dar lugar a trofozoitos activos (Fig. 1·3a) (Despommier y Karapelou, 1987).

El trofozoito es una célula de 7 a 40 μm de diámetro, amorfa, muy dinámica y cuya motilidad es altamente sensible a los cambios de su microambiente, como la temperatura, el pH, la osmolaridad y el potencial redox. Su núcleo, de 4 a 7 μm de diámetro, está rodeado por una capa granular uniforme. La masa de cromatina se halla distribuida generalmente en forma regular, pero en ocasiones se puede encontrar adherida a la cara interna de la membrana nuclear (Martínez-Palomo, 1982). Posee en su citoplasma numerosas vacuolas, cuyo contenido va desde eritrocitos y bacterias hasta desechos celulares. En el citoplasma no se distinguen organelos diferenciados propios de células eucarióticas típicas (Deutsch y

Zaman, 1959; Osada, 1959; Martínez-Palomo, 1982).

Los trofozoitos viven íntimamente adheridos a la mucosa de las últimas regiones del intestino delgado y de todo el intestino grueso, donde se alimentan de células del huésped y se reproducen por fisión binaria. Los trofozoitos pueden invadir la mucosa y pasar a otros órganos, aunque en este caso no pueden completar su ciclo de vida, ya que se hallan imposibilitados para regresar al lumen del intestino (Fig. 1-3b) (Martínez-Palomo, 1982; Despommier y Karapelou, 1987).

El enquistamiento ocurre en el lumen del intestino grueso, y se inicia cuando el trofozoito adopta una forma esférica (Fig. 1-4a). El quiste temprano se caracteriza por la presencia de la pared quística, uno o dos núcleos y tenues apilamientos de ribosomas (Fig. 1-4b) (Despommier y Karapelou, 1987).

El quiste maduro posee cuatro núcleos y por lo general carece de ribosomas en su citoplasma (Fig. 1-4c). El ciclo de vida se completa cuando el quiste es expulsado con la materia fecal hacia el medio ambiente externo, en donde es capaz de resistir una gran variedad de condiciones adversas (Martínez-Palomo, 1982).

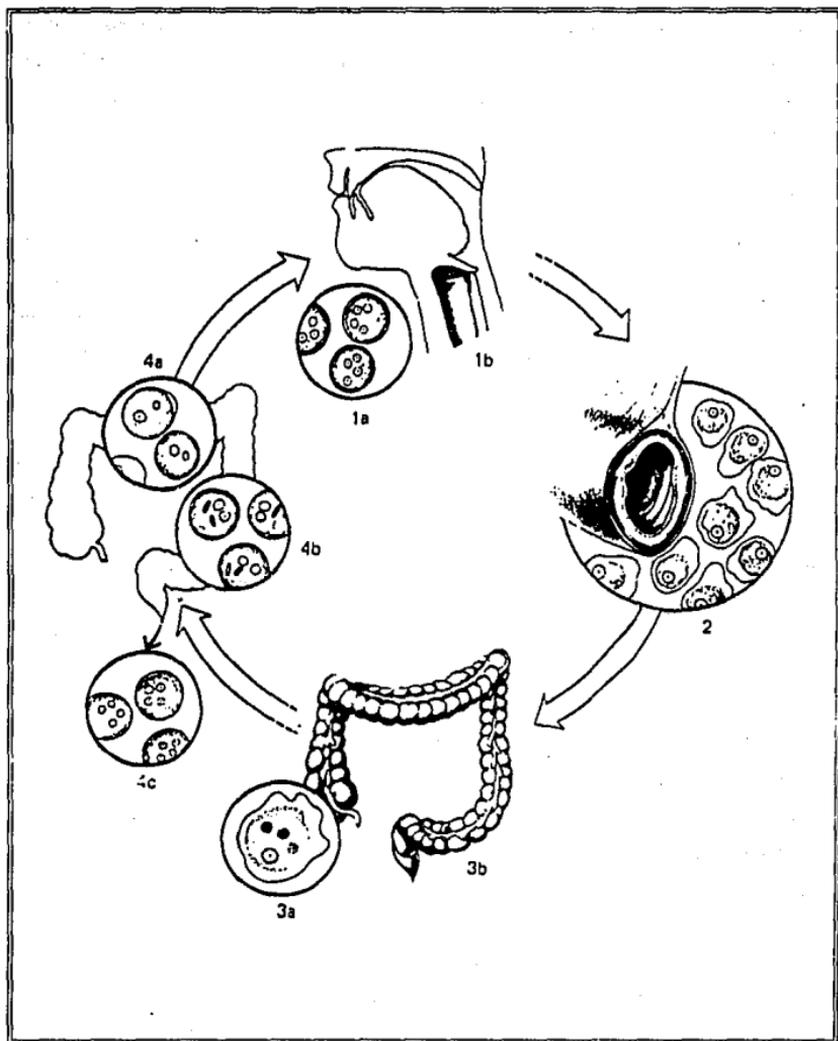
3.3. Factores involucrados en la virulencia amibiana.

Los trofozoitos de *E. histolytica* pueden permanecer en la luz del intestino humano como comensales, pero ocasionalmente pueden invadir la mucosa intestinal produciendo disentería amibiana. En esta etapa son potencialmente capaces de diseminarse por vía sanguínea a otros tejidos, dando lugar a lesiones extra-intestinales. Hasta el momento, no es posible explicar por qué algunas cepas amibianas son capaces de invadir los tejidos del hospedero, mientras que otras permanecen en la luz intestinal, sin producir daño aparente. Se piensa que están involucrados factores del huésped, factores del microambiente y factores propios del parásito (Cook, 1990).

3.3.1. Factores del huésped.

Existen algunos factores del hospedero que se han visto involucrados en el establecimiento de la infección amibiana. Entre estos se encuentran: colesterol sérico aumentado, baja aportación de ácido ascórbico en la dieta, consumo elevado de

Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.
(Ver texto para explicación)



INTRODUCCION

carbohidratos, dieta baja en proteínas, ausencia de exposición previa a las amibas; así como también factores climáticos, emocionales y genéticos (Pérez-Tamayo y Brandt, 1971). Por otra parte, es bien sabido que la incidencia de la amibiasis en el mundo es paralela al nivel sanitario y a la higiene que hay en una comunidad (Elsdon-Dew, 1968).

3.3.2. Factores del microambiente.

Durante mucho tiempo se pensó que la microbiota bacteriana era indispensable para la expresión de la virulencia amibiana. Vincent y Neal (1960) y Phillips y col. (1972) reportaron que las cepas de *E. histolytica* cultivadas axénicamente por tiempo prolongado perdieron irreversiblemente su capacidad de producir lesiones amibianas. Bos y Hage (1975) observaron que la virulencia de los trofozoítos crecidos con bacterias disminuyó cuando las bacterias fueron separadas del medio de cultivo, mientras que la reasociación con bacterias resultó en la readquisición de la patogenicidad. Bos (1975) y Bos y van der Gried (1977) estudiaron la virulencia de varias cepas amibianas y encontraron que aquellas que se cultivaron con bacterias presentaron mayor virulencia que las que se cultivaron axénicamente. Sin embargo, Tanimoto y col. (1971) habían demostrado que inoculando un número elevado de trofozoítos axénicos, es posible producir absceso hepático en hámsteres. Este resultado fue confirmado por varios autores (Diamond y col., 1974; Martínez-Palomo, 1978; Gharidian y Meerovich, 1979; Lushbaugh y col., 1981) quienes encontraron que los trofozoítos cultivados sin asociación bacteriana pueden producir absceso hepático.

Hasta el momento no se conoce la naturaleza de la relación *E. histolytica*-bacteria. Sin embargo, parece ser un fenómeno altamente específico en el que intervienen componentes de la superficie de *E. histolytica* con actividad de lectina y residuos de *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilgalactosamina presentes en la superficie bacteriana (Bracha y col., 1982; Kobilier y Mirelman, 1980).

El incremento en la virulencia se ha correlacionado con la presencia de receptores para manosa (revisado en Mirelman, 1987), y con la actividad de catalasa de algunas cepas bacterianas (Bracha y Mirelman, 1984). Sin embargo, el aumento de la virulencia se da únicamente en la presencia de bacterias intactas, ya que lisados bacterianos y bacterias atenuadas por calor e irradiación no tuvieron efecto alguno sobre la virulencia (Wittner y Rosenbaum,

1970; Mirelman y col., 1983), lo que sugiere que el mecanismo potenciador no se limita a la participación de unas cuantas moléculas, sino que es de mayor complejidad.

3.3.3. Factores propios del parásito.

El mecanismo por el cual los trofozoítos de *E. histolytica* dañan los tejidos del hospedero no está completamente definido, sin embargo existen evidencias suficientes que indican que dicho mecanismo se lleva a cabo en cuatro etapas: adhesión, citólisis dependiente de contacto, fagocitosis y finalmente, una degradación intracelular (Orozco y col., 1983; revisado en Gitler y Mirelman, 1986; Ravdin, 1986; Pérez-Tamayo, 1989).

3.3.3.1. Adhesión.

La adhesión de los trofozoítos de *E. histolytica* a las células epiteliales es el primer paso en el proceso de colonización y de invasión de los tejidos (Orozco y col., 1980). Por lo tanto, se considera un factor importante en la virulencia amibiana y el evento inicial en la citólisis dependiente de contacto (Ravdin y col., 1980; Ravdin y col., 1988) y en la fagocitosis (Trissl y col., 1978; García-Rivera y col., 1982; Orozco y col., 1983), dos de las actividades más importantes en la patogenicidad de *E. histolytica*.

Los trofozoítos de *E. histolytica* se adhieren rápidamente a monocapas de células epiteliales en cultivo y a sustratos inertes como plástico o vidrio. La adhesión de las amibas a las superficies inertes está mediada por mecanismos inespecíficos, mientras que la adhesión a células epiteliales está dada por mecanismos específicos, los cuales requieren del reconocimiento específico de moléculas en la superficie del parásito (adhesinas) y moléculas en la superficie de la célula blanco (receptores) (Martínez-Palomo, 1986).

Hasta el momento se han reportado cinco moléculas involucradas en la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco. Estas son: la adhesina de 112 kDa (Arroyo y Orozco, 1987), la lectina de 220 kDa (Rosales-Encina y col., 1987), la lectina de 170 kDa (Petri y col., 1989), la adhesina de 29 kDa (Vinayak y Shandil, 1990) y la protefna de 66 kDa (Vohra y col., 1992a, 1992b). Así mismo, se han reportado evidencias sobre la participación de proteínas con pesos moleculares de 90, 70, 50 y 24 kDa en la relación parásito-célula blanco (Rodríguez y col., 1989), y sobre el papel de una protefna rica en serina de 46-52 kDa

INTRODUCCION

en la adhesión de los trofozoitos a células CHO (Stanley y col., 1990). Estas moléculas se analizan con más detalle posteriormente.

3.3.3.2. Citólisis dependiente de contacto.

Estudios cinematográficos han mostrado que el efecto citoletal de *E. histolytica* es dependiente de contacto (Ravdin y col., 1980, Ravdin y Guerrant, 1981). No se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales los trofozoitos amibianos lisan las células blanco después de que éstas establecen contacto con el parásito. Se sabe que este efecto es dependiente de temperatura y es óptimo a 37°C (Ravdin y Guerrant, 1981). Aparentemente, la lisis de las células blanco requiere la función de los microfilamentos amibianos, ya que las citocalasinas B y D, drogas que tienen la propiedad de interferir con la formación de los microfilamentos, inhiben el efecto citoletal amibiano sobre células blanco (Guerrant y col., 1981). La lisis de las células blanco también ha sido asociada con el flujo iónico en la membrana de la célula blanco y dentro de la amiba. En la lisis podrían participar algunas de las siguientes moléculas:

a) **Fosfolipasa A.** La fosfolipasa A es una fosfolipasa dependiente de calcio cuya actividad está asociada a la membrana plasmática de los trofozoitos y esta considerada como importante en la actividad citolítica de *E. histolytica* (Long-Krug y col., 1985).

b) **Colagenasa.** Los trofozoitos de cepas patógenas de *E. histolytica* presentan actividad colagenolítica (Muñoz y col., 1982). La actividad de esta enzima esta ausente en los sobrenadantes y sólo se detecta después del contacto de los parásitos con el sustrato de colágeno, lo cual sugiere que la proteasa esta localizada en la membrana plasmática de los trofozoitos y que se requiere de contacto directo entre la amiba y el sustrato para que ocurra la digestión de la colágena, una proteína que se encuentra en grandes cantidades en la matriz extracelular de tejido conectivo (Muñoz y col., 1984).

c) **Amehaporo.** Dos grupos de investigación han reportado la existencia de proteínas de la membrana plasmática de los trofozoitos amibianos capaces de formar poros en la membrana de macrófagos y linfocitos (Lynch y col., 1982, Young y col., 1982). Estas proteínas inducen una rápida despolarización de la membrana de las células mencionadas e inducen un rápido flujo de iones a través de la membrana de vesículas de fosfatidilcolesterol.

El papel de estas proteínas en la patogénesis de la amibiasis no está definido, pero se cree que su participación sea mediante estos cambios de flujo iónico transmembranal detectados cuando las amibas entran en contacto con las células blanco (Ravdin y col., 1985).

Recientemente, el grupo de Leippe reportó el aislamiento y la caracterización de una proteína con propiedades de "amebaporo" a partir de una cepa patógena de *E. histolytica* (Leippe y col., 1991). La secuenciación tanto de la molécula como de su gen, determinó que se trata de una proteína de 8.2 kDa (Leippe, 1992).

d) Otras moléculas con actividad lítica.

Los trofozoítos de *E. histolytica* liberan al medio sustancias con actividad hidrolítica o proteolítica, tales como fosfatasa ácida, β -N-acetil-glucosaminidasa, glucosidasa, amilasas y, en menor extensión esterasas (Lundbland y col., 1981, Trissl, 1983, Werries y col., 1983, Muller y col., 1988), así como también enzimas proteolíticas, de las cuales sólo la proteasa neutra principal descrita por Keene y col. (1986) ha sido purificada y caracterizada (Lushbaugh y col., 1984b; Keene y col., 1989).

Otra de las moléculas descritas es la neuraminidasa, una enzima capaz de liberar ácido N-acetylneuramfínico (NANA) a partir de compuestos como la mucina. Al parecer, ésta enzima tiene un papel importante en la respuesta quimiotáctica del trofozoíto, ya que compuestos con NANA estimulan y dirigen el movimiento de los trofozoítos (Udezulu y Leitch, 1987).

3.3.3.3. Fagocitosis.

La fagocitosis es una característica biológica de los trofozoítos de *E. histolytica* que se ha visto involucrada tanto en la citopatogenicidad *in vitro* como en la invasión de los tejidos *in vivo* (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980, 1982, 1983). Estudios microscópicos han mostrado a trofozoítos amibianos fagocitando activamente células blanco (Chávez y col., 1974).

E. histolytica presenta aparentemente dos tipos de fagocitosis: uno altamente específico, mediado por receptores de superficie llamados adhesinas. Su especificidad se ha demostrado por las diferentes afinidades de los trofozoítos para ingerir eritrocitos de varias

INTRODUCCION

especies de mamíferos y diferentes cepas bacterianas (Ravdin y Guerrant, 1981; Bracha y col., 1982; Olgún, 1984). El otro mecanismo por el cual los trofozoitos hacen contacto con partículas fagocitables, puede ser un mecanismo físico no específico mediado por fuerzas electrostáticas, como ocurre con la ingestión de partículas de almidón, de látex, de fierro, etc. Bracha y col. (1982) observaron que los trofozoitos de *E. histolytica* ingieren rápidamente bacterias no fagocitables cuando éstas están cubiertas con Con A o con anticuerpos antibacterias. Por lo cual, ellos postulan que la adhesión del anticuerpo o de la bacteria cubierta con Con A a la superficie amibiana está mediada por glicoproteínas manosiladas y por otros tipos de moléculas específicas presentes en la membrana plasmática, la cual interacciona fuertemente con moléculas IgG (Bracha y col., 1982). Aparentemente, el enlazamiento de anticuerpos y de la Con A genera una señal, la cual origina su rápida introducción al citoplasma.

Orozco y col. (1980) reportaron que la velocidad de eritrofagocitosis correlaciona directamente con la virulencia de varias cepas estudiadas. A su vez, la velocidad de eritrofagocitosis puede estar determinada por el número y la afinidad de las adhesinas específicas y de otros receptores capaces de interactuar con la célula blanco. Estudios realizados por García-Rivera y col. (1982) utilizando mutantes deficientes en adhesión mostraron que esta deficiencia se refleja en una disminución de la velocidad de fagocitosis, así como también en la disminución de la virulencia *in vivo* e *in vitro* de los trofozoitos. Sin embargo, otros factores tales como las deficiencias para emitir la señal que induce la ingestión, para desacoplar las proteínas del citoesqueleto y/o digerir las partículas ingeridas, pueden afectar la velocidad de fagocitosis y la capacidad de los trofozoitos para producir daño.

3.3.4. Evasión de la respuesta inmune.

Estudios inmunológicos han demostrado que las cepas patógenas de *E. histolytica* presentan resistencia a la lisis por el complemento (Calderón y Tovar-Gallegos, 1980; Reed y col., 1983), redistribuyen sus antígenos de superficie (Pinto da Silva y col., 1975; Trissl y col., 1978; Calderón y col., 1980), desprenden de su membrana plasmática antígenos enlazados a anticuerpos e internalizan una cantidad importante de los antígenos redistribuidos

(Aust-Kettis y Sundquist, 1980; Calderón y col., 1980). Además, se ha observado que los trofozoítos también presentan resistencia a la lisis por leucocitos polimorfonucleares (Tsumumi y col., 1984; Ravdin y col., 1985). Por otra parte, Kretschmer y col. (1985) detectaron un producto amibiano en el sobrenadante de trofozoítos crecidos axénicamente, el cual es capaz de inhibir la motilidad *in vivo* e *in vitro* de fagocitos mononucleares humanos. Estos podrían ser factores de virulencia importantes que favorecerían la supervivencia de los trofozoítos en el hospedero, mediante la evasión de los mecanismos inmunológicos tanto humorales como celulares.

4. Antecedentes directos.

4.1. Importancia de la adhesión en los microorganismos.

La adhesión es un fenómeno biológico generalizado en la naturaleza, que comprende una unión relativamente estable de un microorganismo a una superficie o de una célula a otra. Es una propiedad determinada por moléculas de la superficie celular (Greaves, 1975) y un proceso fundamental en los sistemas biológicos. Como ejemplos se tienen su participación en la evolución de los metazoarios, en la regulación celular, la fertilización y las uniones sexuales, el desarrollo de relaciones de contacto en la embriogénesis e histogénesis, el sistema de reconocimiento del aparato inmunológico y la interacción celular con virus, bacterias y parásitos, entre otras.

Esta propiedad es también un factor importante de virulencia de los microorganismos patógenos, ya que les permite establecerse, multiplicarse e invadir los tejidos que infectan (Smith, 1978); la adhesión puede presentar ventajas y desventajas a un microorganismo parásito: por una parte, es ventajosa porque lo protege de las defensas mecánicas del huésped como las secreciones que bañan a las mucosas, la tos, los estornudos, el movimiento peristáltico intestinal, la descamación de los epitelios, etc., que podrían arrastrarlo hacia el exterior. El patógeno al adherirse fuertemente a las células, resiste este arrastre y puede entonces colonizar sitios específicos en el organismo huésped y en algunas ocasiones, llegar a invadirlos. Por otra parte, la adhesión se convierte en desventaja, porque pone al parásito a disposición del sistema inmune, inmovilizándolo, permitiendo que lleguen hasta él, macrófagos, linfocitos T, anticuerpos, etc. (Smith, 1978).

INTRODUCCION

A partir de estudios empleando mutantes deficientes en adhesión, se ha visto que la capacidad adhesiva de las bacterias, los virus o los protozoarios es paralela a su infectividad (Odumeru y col., 1984; Maurelli y col., 1984; Arroyo y Orozco, 1987), por lo que es importante estudiar los mecanismos de adhesión del microorganismo patógeno a las células epiteliales como un paso esencial en el desarrollo de diversas enfermedades infecciosas.

Se sabe que la adhesión no es un evento al azar, sino que es sumamente específico y selectivo, puesto que para cada patógeno existe un blanco de ataque bien definido en relación a la especie, al tejido, a la región dentro del tejido y a la susceptibilidad del huésped por dicho patógeno. Esto se debe a la especificidad de las moléculas que participan en la adhesión llamadas adhesinas y receptores.

Las moléculas localizadas en la superficie de los microorganismos que participan en la unión específica a la membrana celular de las células blanco, se denominan adhesinas (Shibl, 1985) y son consideradas como factores de patogenicidad ya que intervienen en la colonización del tejido del huésped. De acuerdo con su naturaleza química, son moléculas muy heterogéneas, como fosfolípidos, lipoproteínas, glicoproteínas, glicolípidos, etc. Los receptores son componentes de la superficie de las células huésped que son reconocidos por las adhesinas y generalmente son del tipo de los carbohidratos o residuos de azúcares.

Dada la importancia que las adhesinas tienen en el establecimiento de una infección, se ha desarrollado una intensa búsqueda acerca de los factores que puedan bloquear a las adhesinas y que por lo tanto interfieran en el proceso de colonización de los tejidos de un organismo.

4.2. Proteínas amibianas que participan en la relación parásito-célula blanco.

En *E. histolytica*, no se conoce claramente el proceso de adhesión de los trofozoitos a la célula blanco, ni los factores que median este evento. Sin embargo, algún avance se ha logrado en el conocimiento de componentes de la superficie del trofozoito amibiano, que podrían participar en la adhesión del parásito a las células del hospedero. Se sabe que los trofozoitos de *E. histolytica* presentan cuando menos dos actividades de lectina: una inhibible por *N*-acetilglucosamina (Kobiler y Mirelman, 1980) y la otra inhibible por galactosa y *N*-acetilgalactosamina (Ravdin y Guerrant, 1981); las cuales participan en la adhesión de los

trofozoitos a eritrocitos y a células epiteliales.

Como se expuso anteriormente (ver 3.3.3.1.), se han reportado algunas moléculas que participan en la adhesión de los trofozoitos a la célula blanco, con pesos moleculares de 112 kDa (Arroyo y Orozco, 1987), 220 kDa (Rosales-Encina y col., 1987), 170 kDa (Petri y col., 1989), 66 kDa (Vohra y col. 1992a, 1992b), 29 kDa (Vinayak y Shandil, 1990) y 46-52 kDa (Stanley y col., 1990):

a). Adhesina de 112 kDa. Arroyo y Orozco (1987) identificaron mediante el empleo de mutantes deficientes en adhesión (Rodríguez y Orozco, 1986) y anticuerpos monoclonales dirigidos contra la superficie de los trofozoitos, una adhesina de *E. histolytica* de 112 kDa. Estos autores demostraron por experimentos de inmunofluorescencia, formación de casquete e inmunoadsorción, que la adhesina de 112 kDa se localiza en la superficie de los trofozoitos amibianos. La importancia de esta adhesina en el mecanismo de agresión de *E. histolytica* se sugirió cuando se observó que anticuerpos monoclonales que reconocen la proteína de 112 kDa, inhibieron la adhesión de los trofozoitos a eritrocitos humanos y redujeron la patogenicidad del parásito *in vitro*.

b). Lectina de 220 kDa. Rosales-Encina y col. en 1987, purificaron y caracterizaron parcialmente una proteína de 220 kDa con propiedades de lectina, y su actividad, la cual es inhibida por concentraciones micromolares de ácido hialurónico, quitina y quitotriosa, así como por anticuerpos dirigidos contra la lectina pura. La proteína contiene 9% de carbohidratos por peso, es rica en residuos hidrofóbicos y es muy inmunogénica en ratones, hámsteres y conejos. Esta proteína se une a monocapas fijadas de células epiteliales en cultivo de la línea MDCK e inhibe la adhesión de los trofozoitos a células en cultivo.

c). Lectina de 170 kDa. Petri y col. (1989) purificaron la lectina amibiana cuya actividad es inhibible por galactosa y *N*-acetilgalactosamina. La lectina no reducida tiene un peso molecular de 260 kDa por PAGE-SDS y un punto isoeléctrico de 6.2.

d). Antígeno de 66 kDa. Vohra y col. (1992a, 1992b) reportaron que un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno de superficie de 66 kDa, es capaz de inhibir la adhesión de los trofozoitos a eritrocitos y su posterior fagocitosis, así como la unión a células CHO.

e). Adhesina de 29 kDa. Vinayak y Shandil (1990) reportaron que anticuerpos

INTRODUCCION

monoclonales contra una proteína de membrana de 29 kDa de *E. histolytica* reducen considerablemente la adhesión a células CHO en cultivo y reduce la citotoxicidad a células de riñón de hamster bebé.

f). Antígeno de membrana con múltiples repetidos en *tandem*. Stanley y col. en 1990, reportaron el aislamiento y expresión de este antígeno de superficie, cuya secuencia codifica para una proteína rica en serina. Un antisuero dirigido contra la proteína recombinante reconoce específicamente dos bandas, cuyos pesos son de 46 y 52 kDa. Este antisuero inhibió la adhesión de trofozoitos amebianos a células de la línea CHO *in vitro*, sugiriendo el papel de este antígeno en el contacto con la célula blanco.

También se ha sugerido la participación de otras proteínas, con pesos moleculares de 210, 160, 112, 90, 70, 50 y 24 kDa, en la relación parásito-célula blanco (Rodríguez y col., 1989). Las proteínas de 210 y 160 kDa podrían corresponder a las adhesinas previamente descritas por Rosales-Encina y col. (1987) y Petri y col. (1989), respectivamente. La proteína de 112 kDa corresponde a la adhesina descrita por Arroyo y Orozco (1987), y la de 50 kDa muy probablemente corresponde a la proteína rica en serina descrita por Stanley y col. (1990).

4.3. La proteína de 24 kDa (p24).

Rodríguez y col. (1989), identificaron cuando menos cuatro nuevas moléculas en la superficie de los trofozoitos amebianos con pesos moleculares de 90, 70, 50, y 24 kDa que se encuentran involucradas directa o indirectamente en la relación parásito-célula blanco.

Estos autores estudiaron la unión específica de proteínas de *E. histolytica* a eritrocitos humanos, empleando trofozoitos silvestres y mutantes deficientes en virulencia. Las proteínas que se unieron de manera específica a la superficie de los eritrocitos fueron detectadas por ensayos de inmunotransferencia utilizando anticuerpos policlonales generados contra una clona altamente fagocítica y virulenta de *E. histolytica* (clona A)(Orozco, 1981). Los anticuerpos reconocieron proteínas de 210, 160, 112, 90, 70, 50 y 24 kDa cuando los eritrocitos interaccionaron con trofozoitos de la clona A; y no detectó o detectó débilmente a las proteínas de 112, 90 y 24 kDa cuando los eritrocitos interaccionaron con trofozoitos de las clones L-6 y C₉23, ambas deficientes en fagocitosis y virulencia (Rodríguez, 1990).

Por otra parte, Miguel Angel Vargas en su tesis doctoral (Vargas, 1994), estudió la expresión de estos antígenos de superficie (112, 90 y 24 kDa) en una cepa no patógena (cepa MAV-CINVESTAV) de *E. histolytica* durante su proceso de axenización. Obtuvo las proteínas totales de las clonas MAV polixénica, MAV monoxénica y MAV axénica y las corrió en geles de PAGE-SDS. Después, transfirió estas proteínas a nitrocelulosa para su interacción con anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-p112, anti-p90 y anti-p24. En estos estudios encontró que existe una expresión diferencial de estas moléculas conforme transcurre el proceso de axenización. Así, las proteínas se encuentran presentes en las clonas MAV axénica y A, ambas virulentas y con una eficiencia en adhesión a eritrocitos muy alta, pero no fueron reconocidas en las clonas MAV polixénica y MAV monoxénica, las cuales son no patógenas y tienen una eficiencia de adhesión muy baja. Esto sugiere que estas proteínas, las de 90 y 24 kDa identificadas por primera vez, tienen alguna relación en el proceso de adhesión de *E. histolytica*. En particular, la molécula de 24 kDa, no ha sido caracterizada específicamente en la adhesión del parásito a su célula blanco.

Algunos grupos (Joyce y Ravdin, 1988; Berber y col., 1990; Ximenez y col., 1992) han identificado, mediante ensayos de inmunotransferencia, a una proteína de ≈ 24 kDa dentro de las proteínas de superficie que son más fuertemente reconocidas por sueros de pacientes con abscesos hepáticos. Estos autores sugieren que esta proteína es muy inmunogénica y que quizás sea útil en el diseño de métodos inmunodiagnósticos y epidemiológicos. Esta proteína podría corresponder a la molécula anteriormente descrita en la adhesión a eritrocitos.

También se han reportado otros estudios sobre la caracterización de proteínas de *E. histolytica* muy cercanas al peso de 24 kDa (Tabla 3). Lushbaugh y col. (1979, 1981, 1984a, 1984b) y McGowan y col. (1982) reportaron la identificación y purificación de moléculas con actividad citotóxica de *E. histolytica* con pesos de 24-25, 59, 66 y 68 kDa. Analizando estas fracciones, encontraron una fuerte actividad en la fracción de 24-25 kDa. Feingold y col. (1985) encontraron también actividad tóxica en lisados de trofozoítos amibianos, en una fracción de 15-25 kDa. Esta actividad citotóxica se expresa fuertemente en cepas muy virulentas como la HM1:IMSS y Rahman, y se expresa débil o nulamente en cepas no patógenas como la 303 y moderadamente patógenas como la HK-9.

INTRODUCCION

Por otra parte, Tannich y col. (1991) y Bruchhaus y col. (1992) reportaron la identificación, aislamiento y secuenciación de un gen de *E. histolytica* que codifica para una proteína con actividad de superóxido dismutasa. Los trofozoitos de *E. histolytica* normalmente viven bajo condiciones anaerobias o microaerobias, aunque también pueden respirar aerobicamente. Durante la mayor parte de las condiciones de cultivo, más del 5% del oxígeno en la fase gaseosa del medio de cultivo es perjudicial para la amiba, posiblemente debido a la acumulación de metabolitos tóxicos del oxígeno, tales como los radicales superóxido. La detoxificación de los radicales superóxido se lleva a cabo generalmente por la enzima superóxido dismutasa. La proteína purificada tiene un peso de 25 kDa y se presenta tanto en aislados de cepas patógenas como de no patógenas. Las clonas de cDNA que codifican para la enzima de las dos cepas presentan menos del 5% de diferencia. Hasta el momento, es difícil explicar si estas moléculas tienen alguna relación o no con la p24, ya que por ejemplo, la superóxido dismutasa se encuentra tanto en cepas patógenas como en no patógenas, lo que no concuerda con los resultados obtenidos en la cepa MAV por Vargas (1994), mientras que la citotoxina no ha sido analizada directamente en el proceso de adhesión celular.

4.4. Anticuerpos monoclonales: una herramienta importante en el estudio de los antígenos de los parásitos.

A pesar de que existe una cantidad considerable de información sobre los antígenos de los parásitos en varios sistemas, el progreso ha sido lento en este aspecto de la inmunología de las enfermedades e infecciones parasitarias. Las nuevas tecnologías han ofrecido la esperanza de un progreso más rápido a corto plazo. Actualmente la aplicación de la técnica para producir anticuerpos monoclonales y las técnicas de DNA recombinante contribuyen de manera importante en el análisis de estas moléculas.

En *E. histolytica*, el parásito responsable de la amebiasis humana, se han obtenido varios anticuerpos monoclonales, muchos de ellos dirigidos principalmente contra proteínas o glicoproteínas de la superficie del trofozoito, con el fin de detectar, aislar y caracterizar a este tipo de antígenos, ya que son los que entran primero en contacto con el sistema inmune del huésped (Tabla 4).

Tabla 3. Estudios con proteínas de *Entamoeba histolytica* cercanas a 24 kDa.

PROTEINA (S)	PESO (kDa)	REFERENCIA
Histolisina	26-29	Luaces y Barrett (1988)
Superóxido dismutasa	25	Tannich y col. (1991)
Reconocida por anticuerpos	25	Bruchhaus y col. (1992)
Reconocida por anticuerpos de calostro y pacientes con absceso hepático	23.82, 25.32	Avila y Calderón (1989)
Reconocida por anticuerpos de pacientes con amibiasis intestinal	23, 24, 26	Berber y col. (1990)
Reconocida por anticuerpos de pacientes con amibiasis intestinal	24.5	Ximenez y col. (1992)
Unión a eritrocitos	24	Joyce y Ravdin (1988)
Citotoxina	24-25	Rodríguez y col. (1989)
Proteasa ácida	21 ± 2	Lushbaugh y col. (1979)
Reconocida por anticuerpos de pacientes con amibiasis	20-30	McGowan y col. (1982)
		Lushbaugh y col. (1984a)
		Feingold y col. (1985)
		Scholze y Werries (1984)
		Şchulz y col. (1987)

Los anticuerpos monoclonales han resultado ser excelentes herramientas en la identificación de las moléculas responsables del fenómeno de adhesión, que como en muchos otros parásitos, tiene un papel importante en la patogénesis. En *E. histolytica* la adhesión del trofozoito a células animales es el evento inicial en la citólisis dependiente de contacto y en la fagocitosis involucrada en la invasión y colonización de los tejidos (Ravdin y col., 1980; Ravdin y Guerrant, 1981) y depende de moléculas específicas llamadas adhesinas. En algunos casos, los anticuerpos monoclonales han logrado inhibir la adhesión del trofozoito amibiano a su célula blanco, al actuar sobre las adhesinas de 220, 170, 112 y 29 kDa (Meza y col., 1987; Ravdin y col., 1986; Arroyo y Orozco, 1987; Vinayak y Shandil, 1990). Otros anticuerpos monoclonales han servido eficazmente para la diferenciación de antígenos entre especies tanto del género *Entamoeba* como de cepas y clonas patógenas y no patógenas de la especie *histolytica* (Ximenez y col., 1985; Ortiz-Ortiz y col., 1986; Avila y Calderón,

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales contra *Entamoeba histolytica*.

RECONOCIMIENTO	REFERENCIA
Membrana	López y col. (1982)
Membrana	Ximenez y col. (1985)
Actina	Ungar y col. (1985)
Actina	Rosenblatt y col. (1985)
Membrana	Mendoza y col. (1985)
Membrana	Ortiz-Ortiz y col. (1986)
220 kDa	Meza y col. (1987)
96 kDa	Torian y col. (1987)
112 kDa	Arroyo y Orozco (1987)
29 y 25 kDa	Avila y Calderón (1989)
Glicoproteínas de superficie y lipopeptidofosfoligano	Agundis y col. (1990)
29 kDa	Vinayak y Shandil (1990)
29 kDa	Torian y col. (1990)
30 kDa	Tachibana y col. (1990)
30-200 kDa	Bhattacharya y col. (1990)
170 kDa	Petri y col. (1990a, 1990b)
Quiste y trofozoito	Merino y col. (1990)
125 kDa	Edman y col. (1990)
Membrana, núcleo, citoplasma (14-22, 17-23 kDa)	Tachibana y col. (1991)
Carbohidrato de membrana	Bhattacharya y col. (1992)
84-88 kDa	González-Ruiz y col. (1992)
122, 115, 111 y 65 kDa	Wonsit y col. (1992)
66 kDa	Vohra y col. (1992a, 1992b)
Lipofosfoligano	Prasad y col. (1992)
60 kDa	Mirelman y col. (1992)

1989; Tachibana y col., 1990; Bhattacharya y col., 1990; Petri y col., 1990b; Tachibana y col., 1991; Reed y col., 1992; González-Ruiz, 1992). Así mismo, los anticuerpos monoclonales han servido para caracterizar con más detalle la estructura de algunos antígenos de superficie de la amiba, como las proteínas de 90 y 29 kDa (Torian y col., 1987; Torian y col., 1990) y, finalmente, como reactivos específicos en ensayos de inmunodiagnóstico (Ungar y col., 1985; Agundis y col., 1990; Merino y col., 1990; Wonsit y col., 1992).

TEORIA DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La producción y uso de anticuerpos monoclonales constituye una de las principales revoluciones en inmunología, confirmada por el gran incremento en el número de laboratorios involucrados en este trabajo. Cuando George Köhler y Cesar Milstein reportaron en 1975, por primera vez, la obtención de anticuerpos monoclonales con una especificidad pre-definida (Köhler y Milstein, 1975), se presenció un gran lanzamiento de la inmunología, al desarrollar una forma poderosa de analizar y purificar moléculas individuales a partir de mezclas complejas encontradas en los materiales biológicos. Estos reactivos se han convertido desde entonces en valiosas herramientas en la investigación biomédica, con aplicaciones clínicas para el diagnóstico y la terapia de una gran variedad de enfermedades infecciosas y cáncer, así como en la modulación de la respuesta inmune (Waldmann, 1991).

La también llamada tecnología del hibridoma, fue la culminación de avances y descubrimientos en varios campos aparentemente no relacionados. De particular importancia fueron las pruebas a favor de la teoría de la selección clonal (Nossal y Lederberg, 1958), el desarrollo de técnicas de fusión celular (Okada, 1962; Littlefield, 1964), la inducción artificial de plasmacitomas (Potter y Boyce, 1962) y su adaptación al cultivo celular (Horibata y Harris, 1970). Finalmente, la demostración de que era posible fusionar dos líneas plasmáticas tumorales con el mantenimiento de ambos anticuerpos producidos (Cotton y Milstein, 1973).

1. La teoría de la selección clonal.

El problema de la diversidad de los anticuerpos es uno de los temas centrales de la inmunología. Antes de los años 50, se creía ampliamente que el antígeno debía de alguna manera "instruir" la especificidad de los anticuerpos, al proporcionarle una especie de molde. Sin embargo, la demostración clara de que las proteínas tienen secuencias definidas (Sanger y Thompson, 1953) y el conocimiento gradual de que la secuencia primaria de aminoácidos era suficiente para especificar toda la actividad biológica de una proteína, creó muchas dificultades para las teorías "instruccionistas".

La teoría de la selección clonal de Burnet (1957) evitaba muchas dificultades al

INTRODUCCION

postular que cada linfocito tenía una especificidad única de receptor, y estaba por lo tanto, pre-comprometido para hacer un sólo tipo de anticuerpo después de una estimulación adecuada (Fig. 2). La teoría era capaz de explicar la especificidad de la respuesta inmune dentro de la estructura general de la genética, aunque tomó un poco más de un cuarto de siglo antes de que los mecanismos precisos de la generación de la diversidad fueran comprendidos.

La evidencia en apoyo de la teoría de la selección clonal fue proporcionada primeramente por Nossal y Lederberg (1958), quienes mostraron que, las células productoras, de un sólo tipo de anticuerpo, de ratas inmunizadas con dos diferentes antígenos, producían anticuerpos contra uno u otro antígeno, pero nunca contra los dos. Sin embargo, la teoría de la selección clonal permaneció en la controversia hasta la mitad de los 1960's, y no fue sino hasta la conferencia de Cold Spring Harbor de 1967, que fue generalmente aceptada.

A partir de que la teoría de la selección clonal fue enunciada, se encontró que los linfocitos pueden ser divididos en dos familias. Los linfocitos B, los cuales son los precursores de las células formadoras de anticuerpos, se forman en la médula ósea y llevan formas de "receptores" (anticuerpos), sobre sus superficies. Los linfocitos T se forman en el timo y no producen anticuerpos convencionales. La principal función de los linfocitos T es la regulación de la respuesta inmune de las células B, via "ayuda" y "supresión". Es ampliamente conocido que la selección clonal se aplica tanto a la familia B como a la T (Goding, 1983).

2. Estructura de los anticuerpos.

Los anticuerpos forman la clase de proteínas llamadas inmunoglobulinas. Son moléculas simétricas compuestas de dos cadenas "pesadas" idénticas glicosiladas de peso molecular 50000-75000 y dos cadenas "ligeras" idénticas no glicosiladas de peso molecular \approx 25000. Las cadenas pesadas están unidas por enlaces disulfuro y cada cadena ligera está unida a una pesada por un enlace disulfuro.

Las inmunoglobulinas pueden agruparse en 5 clases principales: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Cada tipo de inmunoglobulina posee características estructurales y biológicas

distintivas. El tipo de molécula de inmunoglobulina está determinado por su cadena pesada. Así, las IgM, IgD, IgG, IgE e IgA poseen cadenas pesadas μ , δ , γ , ϵ y α respectivamente. Además, la IgG puede ser sub-dividida en cuatro subclases (G1-4 en humanos; G1, G2a, G2b y G3 en el ratón; G1, G2a, G2b y G2c en la rata).

Existen dos tipos de cadenas ligeras: κ y λ . Cada tipo de inmunoglobulina contiene moléculas ya sea con cadenas κ o λ . Las moléculas individuales pueden poseer cadenas ligeras κ o λ pero nunca de las dos. En el ratón y en la rata, más del 95% de las cadenas ligeras son κ . En el ratón existe sólo una clase de cadena ligera κ , pero paradójicamente existen cuatro subclases de cadenas λ (I-IV). La cadena ligera juega un papel importante en la determinación de la especificidad de los anticuerpos, aunque todas las funciones "efectoras" de los anticuerpos (p.ej. lisis mediada por complemento) son determinadas por las cadenas pesadas (Goding, 1983; Hood y col., 1984).

3. Control de la respuesta inmune.

La respuesta inmune a la mayoría de los antígenos involucra cientos o miles de clonas de linfocitos, y los productos de estas clonas pueden reconocer muchos sitios diferentes en una molécula antigénica. El pequeño sitio sobre el antígeno al que se unen los sitios de combinación del anticuerpo se llama determinante antigénico. Si un determinante antigénico tiene una estructura conocida, frecuentemente se le conoce como epítipo. En la mayoría de los casos, casi todas las superficies expuestas de las proteínas son antigénicas, si bien es claro que no todas las proteínas son igualmente inmunogénicas. Los antígenos presentes sobre las superficies celulares o fragmentos de membranas son particularmente inmunogénicos, mientras que otros provocan una respuesta más débil que puede incrementarse con el empleo de los adyuvantes (Goding, 1983).

4. Mieloma.

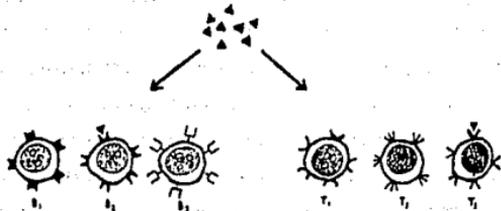
Los mielomas o plasmacitomas son tumores causados por las células productoras de anticuerpos que se han transformado en malignas. Son células que poseen una gran capacidad de proliferación, producen grandes cantidades de inmunoglobulinas anormales, que se denominan proteínas mielómicas. Se trata de un clon inmortal de células descendientes de

Figura 2. La teoría de la selección clonal de la inmunidad.*

De entre los millones de linfocitos B y T presentes en el cuerpo de un vertebrado, existen algunos que interaccionan con cualquier antígeno que entra en el cuerpo. Estas células en particular, cuyos receptores de anticuerpo o de células T se pueden unir al antígeno que ha entrado, son estimuladas por la unión y experimentan una expansión y una maduración. El resultado es la expansión de clonas de células T, que atacan a los antígenos de las células extrañas y clonas de células B que secretan anticuerpos.

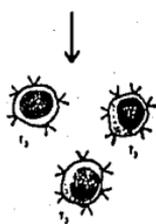
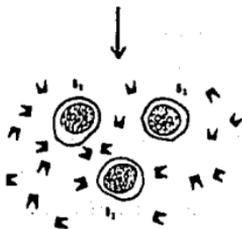
*Tomado de Watson y col. (1987)

ANTIGENO



CELULAS B CON DIFERENTES
ANTICUERPOS UNIDOS A LA MEMBRANA

CELULAS T CON DIFERENTES RECEPTORES
DE CELULAS T



EXPANSION DE LA CLONA DE CELULAS B₂
ACTIVADA QUE SECRETA ANTICUERPOS B₂
QUE SE UNEN AL ANTIGENO QUE LOS ESTIMULO

EXPANSION DE LA CLONA DE
CELULAS T₁ ACTIVADAS CAPACES
DE INTERACCIONAR CON EL ANTIGENO

INTRODUCCION

una única progenitora; las células de mieloma pueden cultivarse indefinidamente y todas las inmunoglobulinas que segreguen tendrán una estructura química idéntica. Estas inmunoglobulinas, son en realidad, anticuerpos monoclonales, pero no existe forma de saber contra qué antígeno se dirigen, ni de qué modo pueden inducirse mielomas que produzcan anticuerpos frente a un antígeno específico (Milstein, 1980).

Los mielomas espontáneos no ocurren muy frecuentemente en ratones pero son comunes en las ratas, y ocasionalmente, ocurren en el hombre. En 1959, se descubrió accidentalmente que sustancias irritantes al peritoneo podían conducir al desarrollo de mielomas en los ratones de la cepa BALB/c. Posteriormente se encontró que el aceite mineral o el pristano eran potentes inductores de mielomas en los ratones BALB/c.

Se han generado líneas celulares de mieloma mutantes, deficientes en la producción de algunas de las cadenas de los anticuerpos, así como en algunas enzimas, las cuales se han convertido en herramientas útiles para la obtención de anticuerpos monoclonales (Goding, 1983).

5. Fusión de las células y selección de los híbridos.

Para obtener anticuerpos monoclonales, primeramente un ratón es inmunizado repetidamente con un antígeno seleccionado. Como resultado, las células B que producen anticuerpos específicos contra ese antígeno proliferan. Después, todos los linfocitos B del animal, altamente enriquecidos en clones de células que reconocen el antígeno, son removidos y fusionados a células de mieloma mutadas cuya propia síntesis de anticuerpos ha sido eliminada. La fusión de células para la immortalización de las células de bazo, requiere de un medio de selección para las mezclas de híbridos (células de bazo-mieloma). El procedimiento de selección (Littlefield, 1964) se basa en la capacidad de las células para usar la vía de "salvamento" para la producción de guanosina cuando la principal vía biosintética está bloqueada (generalmente por los antibióticos aminopterina o ametopterina). Esta vía de salvamento se basa en la presencia de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Las células que carecen de la enzima morirán cuando el medio en el que crezcan contenga hipoxantina, aminopterina y timidina debido a que ambas vías necesarias para la formación de los precursores purínicos del DNA se encuentran bloqueadas (Fig. 3). Sin

embargo, una célula que es *HGPRT*⁻ crecerá en el medio de selección si se fusiona con una célula que es *HGPRT*⁺. Se necesitan mielomas que sean *HGPRT*⁻ para una exitosa selección de los híbridos entre mieloma (*HGPRT*⁻) y una célula de bazo (*HGPRT*⁺) en el medio de selección hipoxantina-aminopterin-timidina (medio HAT) (Liddell y Cryer, 1991).

Cuando las células son tratadas con el virus Sendai o altas concentraciones de polietilenglicol (PEG), sus membranas se fusionan y se forman células multinucleadas llamadas heterocariones. En la siguiente división celular, los núcleos de los heterocariones se fusionan, y las células hijas poseen un número más o menos igual de material genético. Por razones que aún todavía no son bien comprendidas los híbridos resultantes no son genéticamente muy estables, y existe una tendencia fuerte a perder cromosomas al principio (Goding, 1983).

5.1. Híbridomas.

Después de la fusión, las células son sembradas en multicámaras de 96 pozos a concentraciones que resultan aproximadamente en un híbrido viable por pozo. Las células de mieloma mueren porque no pueden sobrevivir en el medio de selección HAT, y las células de bazo eventualmente mueren porque no pueden sobrevivir durante un período largo bajo condiciones de cultivo. Alrededor de 2-3 semanas de cultivo después de la fusión, solamente los híbridos entre las células de bazo y mieloma continúan creciendo. En este punto los híbridos son probados para la producción del anticuerpo de interés, utilizando por lo general, la técnica de ELISA, encontrándose que sólo un número bajo ($\approx 10\%$) de las células fusionadas son capaces de producir anticuerpos. Las células que resultan positivas, son clonadas y re-clonadas para evitar el sobrecrecimiento de otros híbridos o de variantes no productoras. Estas variantes frecuentemente surgen rápidamente después de que un produce un híbrido, posiblemente debido a la segregación de cromosomas que ocurre durante las primeras semanas de cultivo. Después de las clonaciones, algunos de los híbridos positivos se cultivan en masa, se congelan para su futura recuperación o se inyectan en ratones para la obtención de líquido ascítico con un título alto de anticuerpos (Fig.4) (Yelton y Scharff, 1981; Pollock y col., 1984).

INTRODUCCION

Los organismos que crecen en un medio mínimo necesitan sintetizar sus propios ácidos nucleicos. Si se les proporciona un medio mínimo con un inhibidor de la síntesis de nucleótidos, como la aminopterina, las células que carecen de las enzimas de la vía de salvamento morirán.

Las células que carecen de la enzima *HGPRT* (hipoxantina fosforibosil transferasa) no pueden sintetizar sus propios nucleótidos de purina y por lo tanto morirán en un medio mínimo con aminopterina.

Las células que carecen de la enzima *Timidina cinasa* no pueden sintetizar sus propios nucleótidos de pirimidina y por lo tanto morirán en un medio mínimo con aminopterina.

Las células que carecen de ambas enzimas morirán en un medio mínimo con aminopterina.

Las células que carecen de una de las enzimas morirán en un medio mínimo con aminopterina si se les proporciona la otra enzima.

Figura 3. Sistema de selección con el medio HAT.*

Las rutas biosintéticas principales son bloqueadas por la aminopterina. Las células pueden sintetizar sus ácidos nucleicos utilizando la vía de salvamento, si se les proporcionan hipoxantina y timidina. Las células que carecen de las enzimas de la vía de salvamento *HGPRT* o Timidina cinasa, no pueden sintetizar sus ácidos nucleicos y por lo tanto, mueren.

Las células que carecen de la enzima *HGPRT* no pueden sintetizar sus propios nucleótidos de purina y por lo tanto morirán en un medio mínimo con aminopterina.

Las células que carecen de la enzima *Timidina cinasa* no pueden sintetizar sus propios nucleótidos de pirimidina y por lo tanto morirán en un medio mínimo con aminopterina.

Las células que carecen de ambas enzimas morirán en un medio mínimo con aminopterina.

Las células que carecen de una de las enzimas morirán en un medio mínimo con aminopterina si se les proporciona la otra enzima.

Las células que carecen de la enzima *HGPRT* morirán en un medio mínimo con aminopterina si se les proporciona la enzima *Timidina cinasa*.

Las células que carecen de la enzima *Timidina cinasa* morirán en un medio mínimo con aminopterina si se les proporciona la enzima *HGPRT*.

*Tomado de Zola (1987)

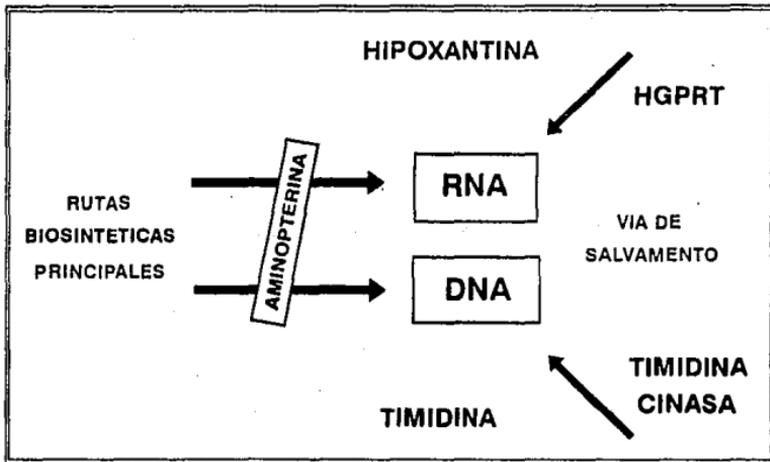
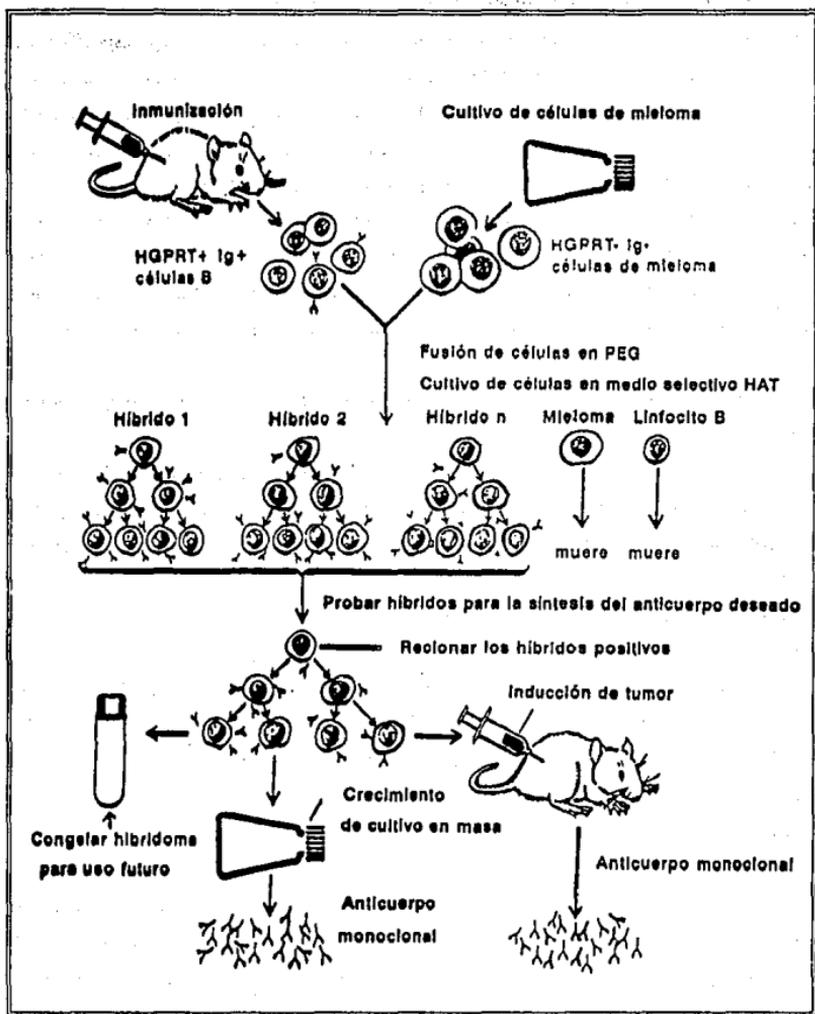


Figura 4. Procedimiento para la obtención de anticuerpos monoclonales.*

(Ver texto para explicación)

*Tomado de Watson y col. (1987)



6. Diferencias entre serología monoclonal y convencional.

Una solución de anticuerpo monoclonal contiene un solo anticuerpo específico con una sola afinidad y un solo isotipo de inmunoglobulina, mientras que una preparación de anticuerpo policlonal contiene una variedad de moléculas de anticuerpo dirigidas contra diferentes porciones del antígeno, así como anticuerpos que no reaccionan con el antígeno de interés. Una preparación de anticuerpo policlonal contiene no sólo anticuerpos contra antígenos "irrelevantes", sino también múltiples anticuerpos diferentes contra el antígeno de interés. En el policlonal hay diferentes isotipos y éstos se comportan de manera diferente al interactuar con el antígeno y con otras células, con el sistema del complemento, entre otros. Habrá anticuerpos con pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos, que reaccionan con el mismo antígeno pero con diferente afinidad. Las propiedades de los anticuerpos policlonales serán una propiedad "promedio" dependiendo de la composición de la mezcla (Zola, 1987).

Una consecuencia de la especificidad de los anticuerpos monoclonales es que relativamente pocas moléculas de anticuerpo se unen a su célula blanco, limitando por lo tanto, su sensibilidad. Esto puede ser cambiado mediante el empleo de una mezcla adecuada de anticuerpos monoclonales para incrementar la unión. Aunque los anticuerpos monoclonales tienden a ser menos sensibles que las mezclas policlonales, muestran una especificidad más grande y un menor fondo.

Una de las principales dificultades en el uso de los antisueros policlonales es la reactividad cruzada -la reacción del suero con un antígeno diferente del antígeno de interés. Con los anticuerpos monoclonales es mucho menor la posibilidad de una reacción cruzada, sin embargo se ha observado reactividad cruzada con ellos y puede causar una interpretación incorrecta de los resultados. Una causa común de la reactividad cruzada en los anticuerpos policlonales, es la presencia en el suero de anticuerpos contra antígenos no relacionados con el antígeno de interés. Este tipo de reactividad cruzada no ocurre con los anticuerpos monoclonales. Sin embargo, un solo tipo de anticuerpo puede reaccionar con macromoléculas, células o tejidos no relacionados si comparten un mismo epitopo. Este caso puede ocurrir tanto con los anticuerpos monoclonales como con los antisueros convencionales (Zola, 1987).

VACUNAS

1. Producción de vacunas.

El enfoque tradicionalista en la obtención de vacunas solía emplear al patógeno completo: virus, bacteria, protozooario, etc. atenuado o muerto. Sin embargo, las llamadas vacunas de nueva generación no emplean ya este enfoque. Su desarrollo conjunta la información inmunológica y los avances en las técnicas de biología molecular. Con este enfoque, las nuevas vacunas sólo incluyen algunas moléculas (nativas o recombinantes), partes de éstas (péptidos sintéticos) o en su defecto, anticuerpos anti-idiotipo que mimetizan alguna estructura original en el patógeno (Estrada, 1992).

Algunas de las vacunas que actualmente se emplean fueron desarrolladas antes del advenimiento de la biología molecular y aunque sólo se han podido obtener un número limitado de ellas, han significado un gran avance científico. Dentro de las vacunas de nueva generación que han demostrado ya una eficacia en los animales en los que se ha probado, se encuentra la de la rabia (Kieny y col., 1988; Rupprecht y col., 1988). No obstante, aún faltan muchas vacunas para prevenir un gran número de enfermedades infecciosas cuya trascendencia en salud puede ser muy seria (Estrada, 1992).

Uno de los avances que ha tenido mayor impacto en los últimos 10 años en el desarrollo de vacunas, ha sido la utilización de los anticuerpos monoclonales para identificar y aislar antígenos de diferentes patógenos. Antes de que se contara con ellos, los inmunólogos trabajaban con mezclas de antígenos, que dificultaban la identificación y aislamiento de antígenos individuales (Woodrow, 1990).

Los anticuerpos monoclonales son excelentes sondas para localizar epítopos en antígenos con variabilidad. Desde un punto de vista inmunológico, los determinantes altamente específicos deben inducir una mayor protección en el hospedero. Sin embargo, desde un punto de vista comercial o de producción, es poco práctico producir vacunas que sólo protejan contra una de varias cepas importantes, o que contengan múltiples variantes de un antígeno protector. Los anticuerpos monoclonales pueden ser empleados para discriminar la mínima variación entre antígenos aparentemente iguales; si se identifica uno con estas características, es posible identificar una porción invariable dentro de la misma molécula, que

posteriormente puede emplearse como inmunógeno y de esta forma intentar inducir protección (Woodrow, 1990).

Es importante hacer notar que los anticuerpos monoclonales pueden identificar cualquier epítipo que sea antigénico, sin importar su naturaleza química. Debido a que algunos antígenos protectores han demostrado ser carbohidratos, es importante determinar la naturaleza química del determinante identificado con anticuerpos monoclonales, ya que dicha información finalmente determina la estrategia a seguir en el aislamiento y consecuente producción de la vacuna que contenga tal antígeno (Estrada, 1992).

2. Inmunoprofilaxia de la amibiasis.

Los estudios sobre inmunidad protectora anti-amibiana se encuentran todavía en etapa experimental; sin embargo, en animales de laboratorio los resultados obtenidos han sido en general satisfactorios. Los modelos animales más utilizados en estudios de inmunoprofilaxis de la amibiasis son el cobayo, el hámster y más recientemente, el jerbo (Tsutsumi y col., 1992).

Los primeros intentos de inducir protección anti-amibiana han sido utilizando extractos crudos de *E. histolytica*. Actualmente, los esfuerzos se han encaminado hacia la utilización de antígenos mejor definidos, menos complejos y más inmunogénicos. Se han probado fracciones ribosomales y lisosomales y los resultados indican que la fracción lisosomal parece ser el mejor candidato para la inducción de inmunidad protectora anti-amibiana (Tsutsumi y col., 1992). Otros experimentos han logrado inducir inmunidad protectora con extractos crudos provenientes de cultivos axénicos, especialmente cuando se utilizaron las fracciones de mayor peso combinadas con adyuvantes como el glucano o el dimicolato de trehalosa.

Sin embargo, otros grupos han comenzado a experimentar la inducción de protección anti-amibiana empleando antígenos altamente purificados. Petri y Ravdin (1991) utilizaron la lectina de 170 kDa en jerbos para probar su capacidad protectora anti-amibiana. La "vacuna" tuvo una eficacia del 67%, sin embargo cuando se presentaron abscesos hepáticos en los animales inmunizados fueron de mayor tamaño que los que se formaron en los animales control; ésto puede sugerir un papel supresor de esta lectina. También se ha intentado la inducción de protección empleando la lectina de 220 kDa (Rosales-Encina y col.,

1987), pero los resultados obtenidos no mostraron el desarrollo de protección alguna y los animales inmunizados presentaron un alto porcentaje de abscesos hepáticos de mayores dimensiones que en los animales control (Tsutsumi y col., 1992). Esto nos lleva a concluir que este tipo de experimentos no han tenido el éxito que se esperaba, probablemente debido a que algunos antígenos tengan epítos supresores. Se ha propuesto que estos epítos sean presentados por células presentadoras de antígeno a células T con actividad supresora, bloqueando de esta manera la activación de la respuesta inmunológica (Tsutsumi y col., 1992).

Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales y de clonación de DNA, jugarán un papel importante en la determinación y producción de antígenos purificados que demuestren eficacia para inducir inmunidad protectora anti-amibiana a futuro.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los objetivos más ambiciosos, dentro del estudio de la amibiasis experimental, es el de obtener una vacuna que pueda inducir una protección efectiva en la población humana. Para tratar de lograr este objetivo, se requiere de un conocimiento profundo de los procesos inmunológicos a nivel molecular dentro de la relación huésped-parásito. Por lo tanto, se necesita de la identificación, aislamiento, purificación y caracterización de los antígenos de los parásitos.

La importancia del estudio de estos antígenos resulta evidente: son necesarios para el inmunodiagnóstico, el análisis inmunopatológico, la cuantificación de las varias respuestas inmunes en los hospederos infectados, vacunados o resistentes naturales, así como para el análisis de la variabilidad fenotípica en las poblaciones de parásitos.

Dado que la proteína de 24 kDa de *E. histolytica* es un antígeno que participa en la relación parásito-célula blanco y que además, parece encontrarse alterado en cepas no patógenas de la amiba, en este trabajo se decidió comenzar su estudio y, principalmente, obtener anticuerpos monoclonales, que como se ha mencionado, serán de gran utilidad para su futura caracterización inmunológica y funcional.

OBJETIVOS

Con base en lo anterior, en esta tesis nos propusimos los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Caracterizar inmunobioquímicamente a la proteína de 24 kDa de *Entamoeba histolytica*.

Objetivos particulares:

1) Caracterizar a la p24 por:

- a) Reconocimiento por anticuerpos policlonales
- b) Determinación del número de proteínas de ese peso
- c) Purificación parcial de la proteína
- d) Determinación de la presencia de oligosacáridos

2) Obtener anticuerpos monoclonales contra esta proteína

3) Caracterizar parcialmente a los anticuerpos monoclonales por:

- a) Isotipo
- b) Purificación parcial
- c) Especificidad
- d) Título

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HMI:IMSS.

Los trofozoitos de amiba de la clona A (Orozco, 1981) fueron cultivados axénicamente a 37°C en tubos de vidrio de 16 x 125 mm con tapa de rosca (P.K., México), con medio TYI-33 (Diamond y col., 1978), suplementado con: 13% de suero bovino (Microlab, México), previamente inactivado a 56°C durante 30 min; 3% de la mezcla de vitaminas de Diamond (Special Diamond Vitamin Mixture, North American Biologicals), 0.25 UI/ml de penicilina (Lakeside, México) y 35 µg/ml de estreptomycin (Lakeside, México). El inóculo deseado se sembró, en tubos con 12 ml del medio TYI-S-33 completo y se dejó en incubación hasta que alcanzó la fase logarítmica de crecimiento. Para resembrar el cultivo de amibas, los tubos se incubaron en un pequeño baño de agua-hielo durante 10-15 min, se agitaron suavemente, para despegar a los trofozoitos de las paredes, y se inocularon en medio fresco.

Para cultivos masivos, los trofozoitos se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm² (50 ml) y de 75 cm² (250 ml) (Falcon, E.U.A.). A las botellas se les colocó un inóculo de 1 y 2 tubos respectivamente, con amibas en fase logarítmica de crecimiento, más medio TYI-S-33 completo, 10 ml para las botellas de 25 cm² y 60 ml para las de 75 cm². Estos cultivos nuevamente se dejaron crecer hasta que alcanzaron la fase logarítmica, momento en el que se cosecharon.

El cultivo ya sea de tubo o de botella, se cosechó por enfriamiento en hielo para que se despegaran las amibas del recipiente, y el medio con los trofozoitos se vació en tubos de polypropylene de 15 ó 50 ml con tapa de rosca (Falcon, E.U.A.), dependiendo del volumen. Se centrifugaron a 360 x g durante 7 min a 4°C (1500 rpm en centrifuga Beckman TJ-6) y el botón celular se lavó dos veces con solución salina amortiguadora de fosfatos estéril (PBS: NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄, pH 7.2). Después, el botón celular se resuspendió en un volumen de 30 ml de PBS y se tomó una alícuota para contar las amibas. Las amibas se contaron en una cámara de Neubauer (Hausser Scientific, E.U.A.), al microscopio de luz.

2. Extracción de proteínas totales de *E. histolytica*.

2.1. Método directo empleando el inhibidor de proteasas

***p*-hidroximercuribenzoato (Método 1).**

La extracción de proteínas totales se realizó modificando el método descrito por Avila y col. (1985) y Calderón y Avila (1986).

Cuando los trofozoitos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, se cosecharon para la extracción de proteínas. Una vez determinado el número de células, el paquete se resuspendió en 1 ml de *p*-hidroximercuribenzoato (PHMB) 100 mM (Sigma, E.U.A.), disuelto en Trizma base [Tris(hidroximetil)aminometano] (Sigma, E.U.A.) 100 mM, por cada 12×10^6 trofozoitos. Para lisar las amibas, éstas se agitaron vigorosamente por 5 min en un aparato "Vortex" (Super-mixer, Lab-Line Instruments Inc., E.U.A.), alternando su colocación en hielo. Al término de esto, la muestra se dividió en alícuotas, de 500 μ l (en tubos Eppendorf, Alemania), una de ellas para cuantificación de proteínas; cuando las muestras no se emplearon para electroforesis se conservaron a -20°C ; cuando se utilizaron para electroforesis las muestras se hirvieron durante 3 min y después se conservaron a -20°C .

2.2. Método de extracción con MgCl_2 -ácido acético empleando el inhibidor de proteasas *N*-etil-maleimida (Método 2).

La realización de esta técnica se basa en el trabajo descrito por Warner y Gorenstein (1977).

Después de que se cosecharon los trofozoitos, se lavaron 2 veces con PBS y se contaron. Después de centrifugar, el botón celular se resuspendió en 1 ml de *N*-etil-maleimida [$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_2$ (NEM)(Sigma, E.U.A.)], 0.1 mM por cada 12×10^6 trofozoitos. La lisis de las amibas se hizo mediante tres ciclos de congelación-descongelación, la muestra se colocó en nitrógeno líquido y después en un baño María a 37°C , aproximadamente 1 min cada vez. A la muestra se le adicionó el detergente Nonidet P-40 (Sigma, E.U.A.) al 10% a una concentración final de 0.1%, y lentamente se le agregaron por un volumen de NEM, 0.1 vol de MgCl_2 (J.T. Baker, México) 1 M y 2 vol de ácido acético glacial (CH_3COOH , Merck, México). Esto se mantuvo en agitación por 1 h a 4°C . Después se centrifugó a 720

x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se colocó en una bolsa de diálisis de 16 mm de diámetro y 25 mm de ancho, con un límite de exclusión de peso molecular de 12000 a 14000 (Spectrapor, Spectrum Medical Industries, Inc.; E.U.A.) y se dializó con soluciones de ácido acético (1 l) a las siguientes concentraciones: 6%, 4.5%, 3% y 1.5%, con cambios de las soluciones cada 8 h. Cuando terminó de dializarse la muestra, se colocó en viales de vidrio y se congelaron en una mezcla de acetona-hielo seco, para colocarse posteriormente en una máquina liofilizadora (Lyph-lock 4.5, Labconco, E.U.A.). Al término de la liofilización, las muestras se conservaron a -20°C.

3. Cuantificación de proteínas empleando el método de Lowry.

La concentración de proteínas se determinó por el método descrito por Lowry y col. (1951), modificado por Oyama y Eagle (1956).

Para la determinación, se emplearon 5 μ l de las muestras de proteína obtenidas por el método 1, a los que se les agregaron 195 μ l de agua bidestilada. A esta muestra, que se preparó por duplicado, se le adicionó 1 ml de una solución preparada al mezclar un volumen de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, México) al 0.5% con 50 volúmenes de una solución de Na_2CO_3 (J.T. Baker, México) al 2% más NaOH (Merck, México) al 0.4% y tartrato de sodio-potasio (Merck, México) al 0.02%. Se mezcló muy bien y se dejó 10 min en reposo a temperatura ambiente. Después se le adicionaron 100 μ l del reactivo de Folin-fenol-Ciocalteus (Merck, México) diluido 1:1 en agua bidestilada. Nuevamente se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente durante 45 min. Posteriormente, se determinó la densidad óptica a una longitud de onda de 750 nm; se colocó la muestra en celdas desechables de poliestireno de 0.75 ml y de 10 x 4 x 45 mm (Sigma, E.U.A.) y se realizó la lectura en un espectrofotómetro Spectronic 601, (Milton Roy, E.U.A.). La concentración de proteínas se obtuvo, con ayuda de un programa de computadora, al interpolar los valores de absorbancia contra una curva de calibración de concentraciones conocidas de BSA, desde 0 a 100 μ g de proteína, por duplicado y bajo las mismas condiciones de la muestra problema.

4. Electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturizantes y reductoras (PAGE-SDS).

En este trabajo se analizaron las proteínas de *E. histolytica* en geles de poli(acrilamida) desnaturizantes, de acuerdo al método de Laemmli (1970), modificado por Avila (1982) y se realizaron geles verticales tanto grandes (206 cm²) como pequeños (40 cm²).

Las proteínas fueron tratadas de la siguiente manera:

i) Para las muestras obtenidas por el método 1, una vez que las proteínas fueron cuantificadas, se colocaron los μ l correspondientes a 1 mg de proteínas y se le adicionó un volumen igual de solución amortiguadora de muestra o de Laemmli 2X (Tris-HCl 125 mM (Sigma, U.S.A.), pH 6.8; dodecil sulfato de sodio (SDS)(Bio-Rad, E.U.A.) 4%, y glicerol (Merck, Alemania) al 20%). Esta mezcla se hirvió en un baño María por 3 min y, después se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso. Cuando se necesitaron las muestras para la electroforesis, se descongelaron lo más rápido posible y se les adicionó el 5% del agente reductor β -Mercaptoetanol (Bio-Rad, E.U.A.); se hirvieron por 2 min en baño María y se colocaron en hielo hasta el momento de cargarse en el gel.

ii) Para las proteínas obtenidas por el método 2, se pesó la cantidad necesaria de proteínas liofilizadas y se disolvieron completamente en un volumen adecuado de solución amortiguadora de muestra 1X (por ejemplo, 1 mg en 250 μ l). Se hirvió la muestra durante 3 min en baño María, después se le adicionó 5% de β -Mercaptoetanol y nuevamente se hirvieron durante 2 min. Al término de este tiempo se colocaron en hielo hasta cargarse en el gel.

Las proteínas se analizaron electroforéticamente en geles de poli(acrilamida) al 12% para resolver mejor a las proteínas de bajo peso molecular.

Para geles verticales grandes se empleó el sistema de electroforesis de Bethesda Research Laboratories (BRL) y para geles pequeños se utilizó el sistema de Bio-Rad (Mini Protean II System). En ambos sistemas se emplearon las siguientes soluciones y todas se filtraron a través de una membrana de 0.45 μ m (Millipore, E.U.A.), solución de monómero: acrilamida (Bio-Rad, E.U.A.) al 30% con 2.7% de bis (*N,N'*-meilen-bis-acrilamida)(Bio-Rad); solución amortiguadora de corrida 4X, que contiene Tris (Sigma, E.U.A.) 1.5 M, pH 8.8 ajustado con HCl; solución amortiguadora concentradora 4X, que contiene Tris 0.5 M,

pH 6.8 ajustado con HCl; SDS al 10% (Bio-Rad, E.U.A.); como solución iniciadora de la reacción persulfato de amonio (Bio-Rad, E.U.A.) al 10% y como catalizador TEMED (Bio Rad, E.U.A.).

Se prepararon dos geles, uno separador y otro concentrador. El gel separador se preparó con las siguientes concentraciones finales: acrilamida al 12%, bis 1.08%; Tris HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%. Esta mezcla se desgasificó en un sistema de vacío durante 10-15 min y después se agregaron persulfato de amonio 0.05% y TEMED al 0.003%. El gel concentrador se preparó con las siguientes concentraciones finales: acrilamida al 4%, bis-acrilamida 0.01%, Tris HCl 0.125 M pH 6.8, SDS al 0.1%, esta mezcla también se desgasificó por 10 min y después se adicionaron persulfato de amonio al 0.05% y TEMED al 0.005%. Tanto el persulfato de amonio, como el TEMED se añadieron a la solución de los geles inmediatamente antes de vaciarla a los moldes.

Los geles grandes se prepararon en moldes de vidrio de 15 x 17 cm y con separadores de 1.5 mm, y los geles pequeños en moldes de 10.2 x 8.8 cm, también con separadores de 1.5 mm. Una vez armado el molde y sellado, se vaciaron 30.01 ml de la solución del gel separador para geles grandes y 10 ml para geles chicos; después se adicionó un poco de agua (≈ 1 ml) para aplanar el gel. Cuando el gel polimerizó (≈ 50 min) se añadió en el espacio restante del molde la solución del gel concentrador e inmediatamente se colocó el peine, formador de pozos (para colocar en éstos las muestras) y se dejó polimerizar (≈ 30 min).

Después, el gel se montó en la cámara de electroforesis (BRL modelo V161 para geles grandes y Bio-Rad modelo Trans-blot para geles chicos) y se le agregó solución amortiguadora de corrida 1X [Tris 0.025 M (Sigma, E.U.A.), glicina 0.192 M (Sigma, E.U.A.) y SDS (Bio-Rad, E.U.A.) al 0.1%]. A las muestras de proteínas se les adicionó colorante azul de bromofenol al 0.1 % (volumen final)(Merck, México) y se colocaron en los pozos las cantidades correspondientes. Los geles grandes se corrieron durante 18 h a 45 voltios y los geles pequeños se corrieron por 1 h a 100 voltios.

5. Electroforesis bi-dimensional en geles de poli(acrilamida).

La electroforesis en geles de dos dimensiones es la combinación de dos técnicas electroforéticas: isoelectroenfoque y electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS.

MATERIALES Y METODOS

Las proteínas amibianas se separaron de acuerdo al método de O'Farrel (1975). Para realizar la primera dimensión se emplearon tubos de vidrio de 16 x 0.8 x 0.25 cm de luz. Estos tubos se lavaron en mezcla crómica [$K_2Cr_2O_7$ (Merck, México) 0.34 M, 300 ml, con 2 l de H_2SO_4 concentrado (Merck, México)], se enjuagaron con agua bidestilada, se lavaron con cloroformo (Merck, México), nuevamente se enjuagaron con agua bidestilada y se hornearon a 250°C durante toda la noche anterior a su uso. Después, los tubos se sellaron de un extremo con cinta para laboratorio "parafilm" (American Can Company, E.U.A.) y se marcaron a los 12.5 cm de largo, a partir del extremo sellado. Se hicieron corridas utilizando 6 tubos. Para formar el gel de la primera dimensión los tubos se llenaron hasta la marca, con ayuda de una manguera fina, con una solución que contenía 2.75 g de urea (Aldrich "Gold Label", E.U.A.), 0.67 ml de una solución de acrilamida/bis (30% T/5.4% C) (Bio-Rad, E.U.A.), 1 ml del detergente no iónico Nonidet P-40 (Sigma, E.U.A.) al 10%, 1 ml de agua destilada desionizada, 0.2 ml de anfolitos de pH 5 a 7 (Bio-Rad, E.U.A.), y 0.05 ml de anfolitos de pH 3 a 10 (Bio-Rad, E.U.A.); esta mezcla se degasificó previamente durante 15 min y después se le adicionaron 3 μ l de persulfato de amonio (Bio-Rad, E.U.A.) al 10% y 3 μ l de TEMED (Bio-Rad, E.U.A.). Los geles de los tubos se dejaron polimerizar por 2 h. Luego, se les retiró el "parafilm" y se enjuagaron con agua bidestilada por ambos extremos.

Una vez que fueron secados con tiras de papel grueso, los tubos se colocaron en el módulo para geles en tubo de la cámara de electroforesis modelo V16 de BRL (E.U.A.), y se colocó encima de cada uno 15 μ l de solución amortiguadora de muestra para la primera dimensión [urea 9.5 M (Aldrich, E.U.A.), NP-40 (Sigma, U.S.A.) al 2%, β -mercaptoetanol (Bio-Rad, E.U.A.) al 5%, anfolitos de pH 5 a 7 (Bio-Rad, E.U.A.) al 1.6% y anfolitos de pH 3 a 10 (Bio-Rad, E.U.A.) al 0.4%] y 15 μ l de solución amortiguadora de muestra de la primera dimensión de cubrimiento ("overlay") (urea 9 M, anfolitos de pH 5 a 7 al 0.8% y anfolitos de pH 3 a 10 al 0.2%). Posteriormente, se adicionó a la cámara superior la solución amortiguadora del cátodo (NaOH 0.02 M) y a la cámara inferior la solución amortiguadora del ánodo (H_3PO_4 0.01 M); los geles se pre-corrieron primero 15 min a 200 voltios, después 30 min a 300 voltios y finalmente 60 min a 400 voltios.

Al término de la pre-corrida, se desechó la solución amortiguadora de la cámara superior, los tubos se sacaron del módulo y se enjuagaron con agua bidestilada por ambos lados. Después se secaron y colocaron nuevamente en el módulo; se les colocó a cada uno 1.5 mg de la muestra de proteínas amibianas obtenidas por el método 2, resuspendida en 80 μ l de la solución amortiguadora de muestra para la primera dimensión y se les adicionaron 10 μ l de la solución amortiguadora de muestra de cubrimiento ("overlay"). La cámara superior se llenó con solución amortiguadora del cátodo nueva y los geles se corrieron durante 20 h a 400 voltios.

Cuando terminó la primera dimensión, los tubos se sacaron del módulo y los geles se sacaron de los tubos aplicando presión positiva en un extremo del tubo. Los geles se recibieron en la solución amortiguadora de equilibrio que contiene Tris HCl (Sigma, E.U.A.) 0.0625 M, pH 6.8, SDS (Bio-Rad) 2.3%, glicerol (Merck, Alemania) 10% y β mercaptoetanol (Bio-Rad, E.U.A.) al 5%; se dejaron equilibrando al menos 1 h o se congelaron a -20°C . Durante el equilibrio, se preparó un gel vertical de poli(acrilamida)-SDS, como se describió en la sección anterior. El gel de la primera dimensión se colocó en la parte superior del gel concentrador y se cubrió con una solución de agar (Difco, E.U.A.) al 1% en solución amortiguadora de equilibrio, además de agregarle azul de bromofenol (0.1% volumen final)(Merck, México). La segunda dimensión se corrió por 18 h a 45 voltios.

6. Tinciones de los geles de poli(acrilamida).

6.1. Tinción con azul de Coomassie.

Una vez que las proteínas fueron separadas en el gel de poli(acrilamida), éste se desmontó tanto de la cámara como de los vidrios y se colocó en un recipiente de vidrio o de plástico que contenía una solución fijadora con metanol (Merck, México) al 50%, ácido acético (Merck, México) al 10%; el gel se dejó en agitación durante 2 h. Después, el gel se tiñó con la solución de azul brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad, E.U.A.) al 0.05% en metanol al 50%, ácido acético al 10%; el gel se volvió a dejar en agitación durante 4 h. Luego de que el gel quedó completamente azul, se destiñó con una solución de metanol al 5%, ácido acético al 7%; el gel se dejó en agitación hasta que las bandas de proteína aparecieron azules sobre un fondo transparente. El gel se guardó en agua y se fotografió o

bien se colocó en bolsas de plástico a 4°C.

6.2. Tinción de PAS para carbohidratos.

La técnica de PAS, reactivo de Schiff-ácido peryódico (*Periodic acid, Schiff's reagent*), se usa para teñir glicoproteínas, heparina, sulfato de condroitina, polisacáridos y otros materiales con un alto contenido de carbohidratos. Es un método que se aplica para la identificación de glicoproteínas separadas en geles de poliacrilamida o agarosa (Strömqvist y Gruffman, 1992).

En este trabajo se tiñeron las proteínas ambianas con la técnica de PAS, siguiendo el protocolo descrito en Fairbanks y col. (1971). Todos los pasos se hicieron en una plataforma con movimiento.

Una vez que terminó la electroforesis de proteínas, el gel fue desmontado de la cámara y de los vidrios y colocado en un recipiente de vidrio para fijarlo con isopropanol (Merck, México) al 25% y ácido acético (Merck, México) al 10% durante toda la noche. Después, el gel se transfirió a isopropanol al 10%, ácido acético al 10%, durante 6-9 h. Luego, el gel se colocó en ácido acético al 10% por toda la noche. Al día siguiente, el gel se trató con 10 volúmenes (200 ml) de ácido peryódico (Merck, Alemania) al 0.5% por 2 h a 4°C en la oscuridad. Posteriormente, se transfirió a 10 volúmenes de arsenito de sodio (Sigma, E.U.A.) al 0.5% y ácido acético al 5% durante 30-60 min. Después, se cambió a 10 volúmenes de arsenito de sodio 0.1%, ácido acético al 5% por 20 min; este paso se repitió una vez más. El gel se colocó en 10 volúmenes de ácido acético al 5% de 10-20 min. Finalmente, el gel se transfirió a 10 volúmenes del reactivo de Schiff y se dejó toda la noche a 4°C; [el reactivo de Schiff se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 2.5 g de fucsina básica (Bio-Rad, E.U.A.) en 500 ml de agua bidestilada. Se agregaron 5 g de metabisulfito de sodio (Sigma, E.U.A.) y 50 ml de HCl (Merck, México) 1 M. Se dejó en agitación por varias horas, después se filtró con 2 g de carbón activado (Merck, Alemania)]. Al día siguiente, las bandas de glicoproteínas se tiñeron de una tonalidad rosa. Para contrastar las bandas y retardar su desvanecimiento, el gel se lavó con metabisulfito de sodio 0.1% en HCl 10 mM, durante varias horas hasta que esta solución de enjuague se tornó rosada.

7. Electroelución de proteínas a partir de geles de poliacrilamida.

La proteína de 24 kDa se electroeluyó de geles preparativos de poliacrilamida-SDS grandes, de acuerdo con la técnica descrita en Hunkapiller y col. (1983). Se emplearon aproximadamente 15 geles al 12%, teñidos con azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad) al 0.5% en isopropanol (Merck, México) al 30% y ácido acético (Merck, México) al 10%, durante 15 min a temperatura ambiente. Estos geles se destiñeron con una solución de metanol (Merck, México) al 16.5% y ácido acético al 5% por 3 h a 4°C. Posteriormente, se cortó de cada uno la banda correspondiente a la proteína de 24 kDa; las bandas se colocaron en tubos de 50 ml con tapa de rosca (Falcon, E.U.A.) y se lavaron con agua bidestilada por 3 h a 4°C, con 4 cambios de agua. Luego, las bandas se colocaron en una caja de Petri y se cortaron en pedacitos, de aproximadamente 5 mm con una navaja de rasurar, que fueron colocados cuidadosamente en las celdas especiales para electroelución. Las celdas se cubrieron en su parte inferior con una membrana de diálisis, con un límite de exclusión de 12000 a 14000 (Spectrapor, E.U.A.). Estas membranas se prepararon humedeciéndolas primero con bicarbonato de amonio (Sigma, E.U.A.) al 1%, a 60°C por 1 h; inmediatamente después se lavaron con agua bidestilada y se humedecieron con SDS (Bio-Rad, E.U.A.) al 0.1%, por 1 h a 60°C; se lavaron con agua bidestilada y se almacenaron en SDS al 0.1% a temperatura ambiente, hasta el momento de usarse. Una vez colocada la membrana y los pedacitos del gel en la celda más grande de la cámara de electroelución, éstos se cubrieron con una solución de bicarbonato de amonio 0.4 M, SDS al 2% y ditiotreitól (DTT)(BRL, E.U.A.) al 0.1% (solución "overlay"); por último, las celdas se cubrieron con la solución amortiguadora de elución que contenía bicarbonato de amonio 0.05 M y SDS al 0.1%. Las celdas se colocaron en el tanque de elución [concentrador electro-eluidor modelo ECU-040 (C.B.S. Scientific Co., E.U.A.)], que previamente se llenó con solución amortiguadora de elución y se le acondicionó una bomba peristáltica para recircular la solución. Se dejó en reposo durante 3 h, tiempo en el que actuó el DTT. Al término de este tiempo, se conectó el tanque a una fuente de poder y se le suministró una energía de 50 voltios durante 12-16 h. Después, se cambió la solución amortiguadora de elución por la de diálisis que contenía bicarbonato de amonio 0.01 M y SDS 0.02% y se aplicaron 80 voltios durante 20 h.

Posteriormente, la proteína eluída ($\approx 200 \mu\text{l}$) se colectó en un vial de vidrio, se congeló en una mezcla de acetona-hielo seco y se liofilizó en una máquina Lyph-lock 4.5 (Labconco, E.U.A.). Finalmente, la proteína se disolvió en $100 \mu\text{l}$ de agua bidestilada y se precipitó con $400 \mu\text{l}$ de metanol/acetona (50:50), durante 12 h o más a -20°C . Para analizar la proteína por electroforesis, se centrifugó la muestra a $16\ 000 \times g$, en una microcentrífuga Eppendorf, durante 20 min a 4°C y el paquete se resuspendió (1:1) en solución amortiguadora de muestra 2X, se colocó en baño María durante 3 min, se le adicionó un 5% de β -mercaptoetanol (Bio-Rad, E.U.A.), se volvió a hervir por 2 min y se colocó en hielo hasta cargarse en un gel de poliacrilamida al 12%.

8. Inmunoelectrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa

(Western blot).

La inmunoelectrotransferencia (frecuentemente referida como *Western blotting*) se usa para identificar antígenos específicos reconocidos por anticuerpos policlonales o monoclonales (Ausubel y col., 1991). Para realizar la transferencia de las proteínas amibianas a nitrocelulosa se utilizó la técnica descrita en Towbin y col. (1979).

8.1. Con un segundo anticuerpo marcado.

Para gel pequeño se realizó lo siguiente: después de la separación electroforética de las proteínas, el gel de poliacrilamida se colocó en un recipiente con solución amortiguadora de transferencia [Tris (Sigma, E.U.A.) 0.025 M, glicina (Sigma, E.U.A.) 0.192 M, pH 8.3 y metanol (Merck, México) al 20%] para equilibrarlo durante 30 min. Por otro lado, se cortó un trozo de papel de nitrocelulosa (NC) (Immobilon-NC, poro $0.45 \mu\text{m}$, Millipore, E.U.A.) del mismo tamaño del gel y se equilibró por 10 min en la misma solución amortiguadora de transferencia. Una vez equilibrados el gel y el papel, se hizo un "emparedado" de la siguiente manera: se colocó la unidad de transferencia (Mini trans-blot, Bio-Rad, E.U.A.), en una bandeja con solución amortiguadora de transferencia, con el lado del cátodo hacia el fondo; primero se colocó un cojinete de fibra "scotch brite" y en seguida un trozo de papel filtro del tamaño de la fibra (Whatman 3, Inglaterra), previamente humedecido en la solución amortiguadora. Sobre el papel filtro se colocó el gel y sobre de

éste, el papel de nitrocelulosa, presionando con un objeto cilíndrico para eliminar cualquier burbuja de aire; después se colocó otro pedazo de papel filtro y un cojinete de fibra. La unidad finalmente se cerró y se colocó en la cámara de transferencia (Mini trans-blot, Bio-Rad, E.U.A.), se le colocó una unidad refrigerante y se llenó con solución amortiguadora de transferencia fría, colocándose posteriormente dentro de un recipiente con hielo, esto con el fin de mantener la temperatura baja y evitar el sobrecalentamiento de la unidad. Finalmente la cámara se conectó a una fuente de poder (Bio-Rad modelo 250/2.5, E.U.A.) y la transferencia se corrió a 100 voltios, 0.2 A, durante 90 min; se cuidó de que el amperaje no llegara a 0.7.

Para gel grande, la transferencia se realizó en semi-seco, con el equipo de *Trans-Blot SD* de Bio-Rad y está basada en los principios descritos en Kyhse-Andersen (1984). Después de la electroforesis de las proteínas, el gel se colocó en un recipiente con solución amortiguadora de transferencia de Bjerrum y Schafer-Nielsen (1986): Tris (Sigma, E.U.A.) 48 mM, glicina (Sigma, E.U.A.) 39 mM, pH 9.2, metanol (Merck, México) al 20% más 0.0375 g de SDS (Bio-Rad, E.U.A.), para 1 l. El gel se dejó equilibrando durante 15 min. Simultáneamente se cortaron pedazos de papel de NC (Immobilon-NC, poro 0.45 μ m, Millipore, E.U.A.) y filtro (Whatman 3, Inglaterra) del tamaño del gel y se dejaron equilibrando también en la misma solución amortiguadora por 15 min. Luego, se colocaron los componentes en la unidad de transferencia de la siguiente manera: primero tres hojas de papel filtro sobre el ánodo de platino, pasando un objeto cilíndrico sobre la superficie para excluir todas las burbujas de aire, después se colocó el papel de NC y en seguida cuidadosamente, el gel, alineándolo en el centro de la membrana; se presionó con el objeto cilíndrico; se colocaron otras 3 hojas de papel filtro encima del gel y se removieron las burbujas de aire con cuidado. Cuando se transfirieron 2 geles, se colocó una hoja de membrana de diálisis pre-humedecida en la solución amortiguadora de transferencia, sobre el papel filtro superior del primer gel. Para terminar, se colocó el cátodo sobre el "emparedado" y se presionó, evitando movimientos bruscos, para asegurar las aldabas. Se empalmó la cubierta protectora sobre la unidad, se conectaron los electrodos a una fuente de poder y se corrió la transferencia a 20 voltios durante 45 min.

Cuando terminó la transferencia (grande o pequeña), la unidad se desmontó, se

MATERIALES Y METODOS

desarmó el "emparedado" y el papel de nitrocelulosa se colocó en un recipiente con leche descremada (blocker, *non-fat dry milk*, Bio-Rad, E.U.A.) al 1% en solución amortiguadora de fosfatos salina 10 mM-Tween, pH 7.4, [PBS-Tween: NaCl (Merck, México) 150 mM y *polyoxyethylene sorbitan monolaurate* (Tween 20) (Sigma, E.U.A.) al 0.05%], durante toda la noche a 4°C, esto para bloquear las uniones inespecíficas de anticuerpos. El gel se tiñó con azul de Coomassie para verificar la eficiencia de la transferencia. Después de bloqueado y para la interacción con los anticuerpos, el papel en algunos casos se cortó en tiras y en otros se dejó completo. En el caso de las tiras, las incubaciones se realizaron en tubos de la marca Nunc (Dinamarca) de 4.5 ml. Para la interacción con el primer anticuerpo, el papel de nitrocelulosa se incubó con: el suero de ratón o conejo (diluido), con el sobrenadante de cultivo (entero o diluido), o con el líquido ascítico (diluido); las diluciones se realizaron con una solución de leche descremada al 1% en PBS 10 mM-Tween. Esta primera interacción se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C con agitación lenta. Luego, al papel de NC se le tiró la solución y se lavó 3 veces con PBS 10 mM-Tween, por 5 min cada lavado a temperatura ambiente.

La interacción con el segundo anticuerpo (anti-ratón o anti-conejo, Sigma, E.U.A.), dirigido contra la región constante del primero y acoplado a la enzima peroxidasa de rábano, se llevó a cabo incubando el papel de NC con este anticuerpo, diluido con la solución de leche descremada al 1% en PBS 10 mM-Tween, con agitación suave durante toda la noche a 4°C o durante 4 h a temperatura ambiente. Después, se lavó el papel a temperatura ambiente, para quitar el exceso de anticuerpo de la siguiente manera: 3 veces con PBS 10 mM-Tween; 2 veces con PBS 20 mM (solución amortiguadora de fosfatos salina 20 mM, pH 7.4 y NaCl 150 mM) y una vez con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.4. Cada lavado duró 5 min. Finalmente, se realizó la detección de los complejos antígeno-anticuerpo incubando el papel en solución reveladora de transferencia [4-cloro-1 naftol (Sigma, E.U.A.) 0.5 mg/ml en metanol, y peróxido de hidrógeno al 0.01% (Merck, Alemania) disueltos en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM. El papel se mantuvo en agitación hasta que fueron visibles las bandas, momento en el que se lavó con agua bidestilada excesivamente para detener la reacción.

8.2. Con una lectina marcada.

Las lectinas son un grupo de proteínas o glicoproteínas con dos o más sitios de unión que reconocen secuencias específicas de residuos de azúcar (Barondes, 1981).

Después de la transferencia de las proteínas ambianas a papel de NC, se incubó éste con una lectina marcada con peroxidasa de rábano. La lectina WGA (*Wheat germ agglutinin*) de *Triticum vulgare* tiene una afinidad por residuos y oligómeros de *N*-acetil- β -D-glucosamina. La WGA no contiene carbohidratos que se unan a proteínas.

El siguiente método se basa en el trabajo descrito en Goding y Handman (1984) y se realizó de la siguiente manera: primeramente se preparó albúmina bovina sérica (BSA) (Sigma, E.U.A.) al 4% en acetato de sodio (Merck, México) 0.1 M, pH 4.5 con *m*-periyodato de sodio (Sigma, E.U.A.) 10 mM, durante 6 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Esta oxidación del periyodato fue necesaria debido a que la BSA únicamente es un 96-99% pura y contiene impurezas de glicoproteína que unían lectinas. El exceso de periyodato se eliminó con glicerol (Merck, Alemania) a una concentración final de 10 mM. Esta solución se dializó toda la noche contra dos cambios de NaCl (Merck, México) al 0.9% y se diluyó en BSA 1% para hacer una solución amortiguadora de lavado-BSA. Esta solución de lavado se usó para saturar los sitios de unión de proteínas sobre el papel de nitrocelulosa, así como para preparar las diluciones de la lectina. Después de la transferencia, el papel de NC se incubó a temperatura ambiente durante 4 h con la solución amortiguadora de lavado con la lectina WGA acoplada a peroxidasa [(Sigma, E.U.A.), preparada en solución amortiguadora de fosfatos, pH 6.8]. Así mismo, se colocó un control de la lectina más el azúcar *N*-acetilglucosamina (Sigma, E.U.A.) 0.2 M, también en solución amortiguadora de lavado-BSA, por 4 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación, los papeles de NC se lavaron con las soluciones amortiguadoras de fosfatos 10 mM-Tween, PBS 20 mM y solución de fosfatos 50 mM, durante 5 min por 3 veces. La detección de la unión de la lectina a las proteínas ambianas glicosiladas se realizó incubando los papeles en solución de revelado para transferencia y se mantuvieron en agitación hasta que las bandas se hicieron visibles, momento en el que fueron lavados excesivamente con agua bidestilada para detener la reacción.

9. Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-amiba.

El ensayo de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (Engvall y Perlman, 1971) se utiliza ampliamente para la detección de antígenos solubles y anticuerpos, y es empleado preferentemente para detectar anticuerpos de los sobrenadantes de hibridomas.

Para realizar el ELISA, primeramente se obtuvieron las proteínas amibianas totales (antígeno), mediante el método 1, se cuantificaron por el método de Lowry y se disolvieron a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ en solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH 9.6 [Na_2CO_3 (J.T. Baker, México) 0.2 M, 40 ml, más NaHCO_3 (J.T. Baker, México) 0.2 M, 85 ml y H_2O para 250 ml]. Con esto se recubrieron microplacas de 96 pozos de fondo plano (Linbro, E.U.A. o Immulon No.1, Dynatech, E.U.A.); se colocaron 200 μl por pozo y las placas se dejaron en incubación a 4°C por toda la noche. Al día siguiente, se eliminó el sobrenadante y los pozos se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos salina 10 mM-Tween, pH 7.4 (PBS-Tween)(ver sección 8.1.). Los sitios no cubiertos por el antígeno fueron bloqueados con leche semi-descremada (blocker, *non-fat dry milk*, Bio-Rad, E.U.A.) al 0.5%. Las multicámaras se incubaron con el bloqueador durante 45 min a 37°C. Después, a las microplacas se les tiró el sobrenadante y se lavaron 4 veces con PBS-Tween.

Para la identificación de anticuerpos anti-amiba se emplearon 100 μl por pozo, ya fuera de diluciones de suero de ratón (pre-inmune e inmune), de sobrenadante de cultivo o de líquido ascítico. Las multicámaras se incubaron con el primer anticuerpo a 4°C toda la noche o a 37°C durante 90 min. Luego, se retiró el sobrenadante de tal manera que no se mezclaran los contenidos de los pozos. Estos se lavaron 3 veces con PBS-Tween y la placa se colocó hacia abajo sobre papel absorbente para que se secase bien. Después a cada pozo se le agregaron 100 μl del conjugado de anticuerpos de cabra anti-ratón acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (Sigma, E.U.A.) a una dilución 1:10 000 en PBS-Tween con leche semi-descremada al 0.5%. Las microplacas se incubaron a 37°C durante 90 min o a temperatura ambiente durante 3 h. De nuevo se eliminó el sobrenadante de las placas y se lavaron 3 veces con la solución de PBS-Tween. Para observar la reacción enzimática, se añadieron 200 μl de solución reveladora con el sustrato para la enzima que consistió en ϕ -fenilendiamina (Sigma, E.U.A.) y peróxido de hidrógeno (Merck, Alemania), ambos al

0.04% en solución amortiguadora de fosfato [Na_2HPO_4 (Merck, México)] 0.05 M y citrato [ácido cítrico (Sigma, E.U.A.)] 0.025 M, pH 5.0. Las placas se incubaron a 37°C, en oscuridad, durante 30 min o más, hasta ver claramente el color de la reacción. Para parar el desarrollo de la reacción se agregaron a cada pozo una gota de H_2SO_4 2.5 M. Las placas se colocaron en un lector de microplacas (Titertek Plus MS2, ICN Flow, E.U.A.), y se efectuó su lectura a una longitud de 490 nm.

10. Inmunización de ratones de la cepa BALB/c con la proteína de 24 kDa para la obtención de células de bazo para fusión celular.

La parte fundamental de este trabajo consistió en la obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína de 24 kDa de *E. histolytica*. Para tal efecto, fue necesario obtener inicialmente una respuesta inmune en ratones contra este antígeno. Los ratones son preferentemente usados para obtener anticuerpos monoclonales ya que existen líneas celulares de mieloma de ratón bien establecidas y además los híbridos resultantes tienden a ser más estables (Dunbar, 1987).

10.1. Aislamiento de la proteína de 24 kDa.

La proteína de 24 kDa fue aislada a partir de geles preparativos grandes de poliácridamida-SDS al 12% con muestras de proteínas obtenidas por el método 1. La proteína se identificó con ayuda de marcadores de peso molecular, se cortó del gel con un bisturí y las bandas colectadas se lavaron con agua bidestilada durante 10 min y se almacenaron a -20°C hasta ser preparadas para inmunizarse en los animales.

10.2. Cuantificación.

Los geles de poliácridamida-SDS fueron cargados con una cantidad conocida de proteínas totales de ameba, pero, ya separadas las proteínas, no se sabía que cantidad del total correspondería a la proteína de 24 kDa. Para conocer aproximadamente la cantidad de proteína que se concentraba en la banda de gel, se sometió a electroforesis una pequeña muestra de proteínas totales amebianas en un único pozo; el gel se tiñó con azul de Coomassie y se destiñó con los procedimientos descritos anteriormente. Este pequeño gel se

colocó, cubierto con un plástico, en un adaptador para realizar pruebas de densitometría en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-7 (E.U.A.). Esta prueba se llevó a cabo a una longitud de onda de 550 nm y el aparato graficó automáticamente un "barrido" en el que se localizaron los picos correspondientes a las diversas proteínas amibianas. Asimismo, se realizó una prueba con marcadores de peso molecular. El pico correspondiente a la proteína de 24 kDa fue identificado y comparado por peso con el total de los picos registrados. De esta manera se obtuvo un valor aproximado del porcentaje que representa esta proteína con respecto al resto de las proteínas amibianas.

10.3. Esquema de inmunización.

La estimulación de una respuesta inmune humoral efectiva en los ratones es crítica para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un antígeno particular. Como se sabe, la respuesta inmune es adaptativa, es decir, si un animal es inmunizado con un antígeno al que nunca antes se había encontrado, producirá una pequeña cantidad de anticuerpos (respuesta primaria). Si, después de algún tiempo, el mismo antígeno es reinmunizado, la respuesta de anticuerpos (respuesta secundaria) es más rápida, más fuerte (se produce más anticuerpo) y es cualitativamente diferente (se hacen diferentes tipos de moléculas de anticuerpo y generalmente se unen con más alta afinidad al antígeno, en comparación con la respuesta primaria). Los protocolos de inmunización deben tomar en consideración estos rasgos de la respuesta de anticuerpos (Zola, 1987).

Para la inmunización de los animales se consideraron los siguientes aspectos:

Antígeno. Una vez que se tuvo un valor aproximado de la cantidad de proteína en las bandas de geles de poliacrilamida, se hizo un cálculo para inmunizar $\approx 50 \mu\text{g}$ de ésta por cada ratón. Se inmunizaron 6 ratones de la cepa BALB/c en total. La mezcla para inmunizar se preparó de la siguiente manera: se colocó la cantidad necesaria de proteína en un homogenizador de vidrio de 7 ml (Wheaton, E.U.A.) y se agregaron 1.2 ml de solución amortiguadora de fosfatos salina, 0.15 M, pH 7.2; con el pistilo de baja presión (tipo B) se homogenizó la proteína. Después, esta solución se colocó en una jeringa desechable de 5 ml (*Plastipack*, Becton-Dickinson, México), sellada en el extremo de la aguja, sin su émbolo, y se le adicionaron 1.2 ml de adyuvante completo de Freund (Gibco, E.U.A.), (muy bien

homogenizado) para el primer reto, o adyuvante incompleto de Freund (Gibco, E.U.A.), para los siguientes retos. El adyuvante se empleó para incrementar y estimular una buena respuesta contra el antígeno. Una vez agregado el adyuvante, se procedió a hacer una emulsión con la ayuda de una jeringa de 1 ml (sin aguja). Esta se colocó dentro de la de 5 ml, subiendo y bajando continuamente el émbolo para mezclar los componentes. Lo anterior se realizó hasta que se obtuvo una pasta uniforme. Después, se retiró la jeringa de 1 ml y a la de 5 ml se le colocó su émbolo. Se le colocó una aguja de 18 x 38 mm (1 1/2) (Yale, Becton-Dickinson, México). Así, la mezcla estuvo lista para ser inmunizada en ratones.

Animales. Se eligió la cepa de ratones BALB/c debido básicamente a que las líneas celulares de mieloma utilizadas para la fusión son originarias de esta cepa; además era mejor si posteriormente se deseaba obtener líquido ascítico de tumores.

Se emplearon 6 ratones machos de 8 semanas de vida. Cada ratón fue marcado para su identificación. Se hizo una pequeña perforación en el borde de la oreja derecha utilizando el código de marcaje de ratones.

Antes de ser inmunizados por primera vez, los ratones fueron sangrados para obtener suero preinmune. Los animales se sangraron de la vena retroorbital, sujetándolos firmemente e introduciendo una pipeta Pasteur de vidrio larga, que se movió lentamente y con rotación axial hasta que la sangre fluyó por el tubo. Esta se colectó en tubos Eppendorf, se retrajo el coágulo, se dejó a 4°C toda la noche y al día siguiente se colectó el suero, el cual se conservó a -20°C. Este suero se probó por ELISA y *Western-blot*, para detectar si reaccionaba con proteínas amibianas y determinar el título de anticuerpos.

Inmunización. Se inmunizaron 400 μ l (\approx 50 μ g) de la mezcla para cada ratón, por vía intraperitoneal. Los ratones se reinmunizaron en 2 ocasiones más, con intervalos de 15 días entre los retos.

Después de la tercera inmunización, los animales se sangraron nuevamente para conocer el título de anticuerpos contra la proteína de 24 kDa. Cuatro días después del último reto, se extrajeron los bazo de aquellos ratones que presentaron la mejor respuesta humoral contra este antígeno.

11. Extracción de macrófagos de peritoneo de ratón como células alimentadoras de mieloma e hibridomas.

Los macrófagos se utilizaron como células alimentadoras en los cultivos de células de mieloma y de hibridomas. Para obtenerlos se usaron ratones hembras adultos de la cepa BALB/c.

Los animales se anestesiaron con cloroformo (Merck, México) hasta la muerte, se lavaron perfectamente con agua bidestilada y cloruro de benzalconio (Anti-benzil, México; diluido 1:1), y se fijaron a una tabla de disección. La obtención de los macrófagos se realizó en condiciones de esterilidad. Con pinzas y tijeras se retiró la piel del abdomen, cuidando de no rasgar el peritoneo. En la cavidad peritoneal, se inyectaron 5 ml de medio Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, E.U.A.) con una jeringa de 5 ml estéril (*Plastipack*, Becton-Dickinson, México), ésta se dejó insertada en la cavidad peritoneal y se le dio masaje al animal durante 5 min. Después se le retiró el DMEM, cuidando de no perforar los intestinos del ratón.

El DMEM con células del peritoneo, se pasó a un tubo nuevo y estéril de 15 ml (Falcon, E.U.A.) y se centrifugó a 360 x g a 4°C durante 5 min. El botón celular se resuspendió en el medio de cultivo adecuado, de acuerdo a su utilización: para descongelar, propagar células de mieloma e hibridomas se usó medio Dulbecco completo [suplementado con 20% de suero fetal bovino (Hy-Clone, E.U.A.), previamente inactivado a 56°C, glutamina (Sigma, E.U.A.) 200 mM, glicina (Sigma, E.U.A.) 0.15 mM, 2-mercaptoetanol (Bio-Rad, E.U.A.) 0.01 M, fungizona (anfotericina B, Gibco, E.U.A.) 250 µg/ml, 100 UI/ml de penicilina (Lakeside, México) y 100 µg/ml de estreptomycin (Lakeside, México). Todas las soluciones, a excepción del suero, se esterilizaron por filtración en membranas de 0.1 µm (Millipore, E.U.A.)]; para la selección de hibridomas se usó medio Dulbecco completo con el suplemento de medio HAT (Hipoxantina, Aminopterina, Timidina) (50X)(Sigma, E.U.A.), 2.4 ml para 120 ml de medio (Dulbecco-HAT). Los macrófagos se sembraron en multicámaras de 96 ó 24 pozos (Linbro, E.U.A.) o en botellas de cultivo de 25 cm² (50 ml) o de 75 cm² (250 ml) (Falcon, E.U.A.). Se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 7% con una humedad relativa del 85 al 95%. Antes de usarse se verificó que no hubiera contaminación microbiana.

12. Cultivo de células de mieloma de la línea P3-X63-Ag8.653.

Una vez que los ratones mostraron una buena respuesta humoral contra la proteína de 24 kDa, se procedió a preparar la línea celular de mieloma para la fusión con las células de bazo.

Las células de mieloma de la línea P3-X63-Ag8.653 (Kearney y col., 1979) fueron descongeladas para ser cultivadas en medio Dulbecco completo. Inicialmente se cultivaron en microplacas de 24 pozos, previamente sembradas con macrófagos.

12.1 Curva de crecimiento y determinación de la fase logarítmica.

Después de que las células se descongelaron y comenzaron a crecer continuamente, se subdividió el cultivo para su expansión y para tener una cantidad suficiente de células para obtener una curva de crecimiento. La curva de crecimiento ayudó a determinar la fase logarítmica del cultivo y se realizó de la siguiente manera: las células de mieloma se cosecharon, desprendiéndose por agitación, se centrifugaron por 5 min a $360 \times g$ a $4^\circ C$, se resuspendieron en un volumen de medio (p.ej. 15-20 ml), se tomó una alícuota y se contaron en una cámara de Neubauer. Se colocaron 5 ml de medio Dulbecco completo en 20 cajas de Petri de cultivo de 60 X 15 mm (Falcon, E.U.A.) y se adicionaron aproximadamente 50,000 células por caja. Las cajas se incubaron a $37^\circ C$, en una atmósfera de CO_2 al 7%, y una humedad relativa del 85 al 95%. Cada 12 h se retiraron dos cajas para el conteo de las células hasta completar las 120 h. Para contar las células, éstas se despegaron de la caja con una pipeta Pasteur subiendo y bajando el medio, cuidando de no hacer demasiadas burbujas. Las cajas se revisaron al microscopio para corroborar que no quedaran células en ellas. Las células se contaron en una cámara de Neubauer y se sacó un promedio de las dos cajas. Con estos datos se graficó el número de células contra el tiempo. El tiempo de división (t_D) se calculó a partir de la siguiente expresión (Goding, 1983):

$$t_D = \frac{0.693 t}{\ln \frac{N}{N_0}}$$

donde:	t	= tiempo transcurrido
	N_0	= número inicial de células
	N	= número final de células
	e	= 2.7183

Cuando se conoció el tiempo de división, se sembró un inóculo para tener a las células el día de la fusión en fase logarítmica, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{N}{N_0} = e^{\frac{0.693 t}{t_0}}$$

Las células se cultivaron en medio Dulbecco completo suplementado con 8-azaguanina (Gibco, E.U.A.) a 20 $\mu\text{g/ml}$, durante 1 semana, con el fin de eliminar posibles células revertantes. Este compuesto es incorporado en los ácidos nucleicos por la enzima HGPRT (hipoxantina guanosina fosforibosil transferasa) y mata a la célula. Así, este compuesto purgó a la población en cultivo de cualquier posible célula que hubiera revertido en la expresión de la enzima.

Cinco días antes de la fusión se sembraron dos inóculos de células de mieloma en medio Dulbecco completo, en botellas de cultivo de 75 cm^2 (Falcon, E.U.A.) para tener 25×10^6 células por botella.

12.2. Prueba de viabilidad por exclusión con azul tripano.

La prueba de exclusión de colorante es usada para determinar el número de células viables presentes en una suspensión de células. Se basa en el principio de que las células que están vivas poseen membranas intactas que excluyen ciertos colorantes, tales como el azul

tripano, eosina o propidium, mientras que las células muertas no lo hacen. Por lo tanto, en esta prueba, una célula viable tendrá un citoplasma claro, mientras que una célula muerta tendrá un citoplasma azul (Coligan y col., 1992).

Para determinar la viabilidad, las células de mieloma o de bazo se centrifugaron durante 5 min a 360 x g a 4°C y la pastilla se resuspendió en medio Dulbecco (sin suero). Se tomó un volumen de las células (p.ej. 100 µl) y se mezcló 1:1 con una solución de azul tripano (Gibco, U.S.A.) al 0.4% en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2; se dejó en reposo durante 3 min a temperatura ambiente. Se tomó una alícuota de la mezcla y se contaron las células, teñidas y no teñidas, en una cámara de Neubauer. El porcentaje de viabilidad se determinó de la siguiente forma:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{número total de células viables (no teñidas)}}{\text{número total de células (teñidas y no teñidas)}} \times 100$$

13. Fusión celular entre células de mieloma y células de bazo inmune.

Para la obtención de los hibridomas, se llevaron a cabo dos fusiones, empleando los bazos de 2 ratones que presentaron los títulos más altos de anticuerpos anti-p24, tanto por ELISA como por *Western-blot*. Para cada fusión se emplearon tubos cónicos de 15 y 50 ml (Falcon, E.U.A.) nuevos y estériles y se realizó lo siguiente:

Primeramente, los ratones seleccionados se sangraron para obtener una muestra de sus sueros; después, se anestesiaron hasta la muerte con cloroformo, se lavaron muy bien con agua bi-distilada, alcohol (95%) y cloruro de benzalconio (Anti-benzil, México, diluido 1:1). Se colocaron sobre una tabla de disección, en condiciones de esterilidad, y con pinzas y tijeras se procedió a abrir para levantar la piel y localizar el bazo, el cual se extrajo con cuidado y se colocó en una caja de Petri con medio Dulbecco. El bazo se disgregó en la campana de flujo laminar, utilizando pinzas y agujas estériles, picando primero y disgregando suavemente, posteriormente se resuspendió muy bien y se pasó a un tubo cónico de 15 ml con pipeta Pasteur (cada bazo por separado). Se dejó en reposo por 5 min, para sedimentar los trozos grandes de tejido; el sobrenadante se pasó a otro tubo y se dejó reposar por 1

MATERIALES Y METODOS

min; luego, se recuperó el sobrenadante, sin llegar a tocar el fondo y se centrifugó a 360 x g por 5 min a 4°C; el sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió muy bien agitando el tubo con la mano. Se adicionó un volumen de cloruro de amonio (Merck, México) 0.16 M, amortiguado con Tris (Sigma, E.U.A.) 0.17 M, pH 7.6 en una proporción de 9:1 y con un pH final de 7.2, y se incubó el tubo en la mano durante 2 min para lisar los eritrocitos. El tubo se llenó lentamente (por las paredes) con medio Dulbecco y se centrifugó a 360 x g durante 5 min a 4°C; las células se lavaron con Dulbecco 2 veces más de la misma manera, se resuspendió el botón celular en 10 ml de medio Dulbecco, se tomó una muestra para contar y se realizó la prueba de viabilidad con azul tripano.

Las células de mieloma (en fase log) se despegaron por agitación fuerte de la botella 6 veces. Las células se pasaron a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 360 x g por 5 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó, la pastilla se resuspendió muy bien y se lavó 2 veces con medio Dulbecco. El sobrenadante se eliminó, la pastilla se resuspendió muy bien y se adicionaron 5 ml de medio Dulbecco; se tomó una alícuota para contar y se realizó la prueba de viabilidad con azul tripano.

Una vez que estuvieron listas las células de bazo y de mieloma, se realizó la fusión en un tubo cónico de 50 ml, siguiendo la técnica descrita en Fazekas de St. Groth y Scheidegger (1980). Las células se mezclaron en una relación 1:1, utilizando 3.3×10^6 células de bazo y el mismo número de células de mieloma; el tubo se llenó con medio Dulbecco y las células se centrifugaron a 360 x g por 5 min. El sobrenadante se eliminó muy bien, la pastilla se resuspendió suavemente, con la mano y se adicionó 1 ml de polietilenglicol 400 (PEG 400) (Gibco, E.U.A.), dejándose 1 min en la mano con rotación suave. El PEG se diluyó poco a poco con medio Dulbecco, mezclando suavemente, hasta llegar a una concentración final de 5%. Esta mezcla celular se incubó a 37°C por 5 min, después se centrifugó a 300 x g durante 5 min y luego, se resuspendieron en el medio de selección (Littlefield, 1964), llamado Dulbecco-HAT (ver sección 11). Finalmente, la mezcla de fusión se sembró en multicámaras de 96 pozos, fondo plano (Linbro, E.U.A.), sembradas previamente con macrófagos (1 ó 2 días antes); se colocaron 5 ml por multicámara, aproximadamente 50 μ l por pozo. Las multicámaras se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 7% y una humedad relativa del 90%.

14. Cultivo y clonación de hibridomas.

Después de la fusión, las células se re-alimentaron cada tercer día. Durante los primeros 10 días con el medio Dulbecco-HAT, luego se cambió el medio de cultivo a Dulbecco-HT [medio Dulbecco completo con el suplemento de Hipoxantina-Timidina (HT)(50X)(Sigma, E.U.A.) 2.4 ml para 120 ml] hasta el día 18, en el que se cambió este medio a medio Dulbecco completo. Aproximadamente 21 días después de realizada la fusión, se tuvo certeza de que las únicas células sobrevivientes fueron los híbridos que resultaron formados de las células de bazo inmune y las células de mieloma (hibridomas). Para observar el crecimiento de las clonas y detectar posibles agentes contaminantes, los cultivos se revisaron todos los días al microscopio. Los pozos en los que hubo clonas se registraron y marcaron. Cuando las colonias de células ocuparon 3/4 del pozo y el medio de cultivo se tornó de un color amarillento, los sobrenadantes se colectaron para determinar la presencia de anticuerpos anti-amiba por ELISA.

Para su propagación y clonación, los hibridomas que resultaron positivos por ELISA, se desprendieron del pozo, se tomó el medio con una pipeta pasteur larga y se dirigió el flujo hacia uno de los lados del pozo, para no dañar a las células. Se transfirieron aproximadamente 3/4 partes del cultivo a un pozo de una placa de cultivo de 24 (con macrófagos) y el resto se dejó en el pozo para conservar la colonia original (ésta después se congeló).

Cuando las nuevas colonias (positivas) se encontraron en la fase log de crecimiento, se procedió a su clonación por medio de la técnica de dilución limitante. Los anticuerpos monoclonales son secretados por la progenie de una sola célula que tiene la capacidad de producir un solo tipo de molécula de anticuerpo, por lo tanto, se requiere la clonación para evitar problemas de poliespecificidad y para minimizar el riesgo de sobrecrecimiento de células no productoras. Aunque la clonación puede realizarse por la técnica de agar suave, las clonas derivadas de esta técnica deben de adaptarse a cultivo líquido para que los sobrenadantes se puedan probar (Coffino y col., 1972). Debido a que la clonación por dilución limitante permite probar directamente los sobrenadantes, este método es mucho más ventajoso. La clonación por dilución limitante es un método basado en la distribución de Poisson: la dilución de las células en un número apropiado por pozo puede maximizar la

proporción de pozos que contienen una sola clona (Ausubel y col., 1991). La técnica empleada se basó en el trabajo de McKearn (1980).

Las células se despegaron suavemente del pozo, con una pipeta Pasteur, y se pasaron a un tubo cónico de 15 ml (Falcon, E.U.A.); se contaron en una cámara de Neubauer, y se calculó el número de células por mililitro. Después, se realizaron 2 diluciones, en tubos de 2 ml (Nunc, Dinamarca): primeramente una 1:10, tomando del tubo de 15 ml y, a partir de ésta otra 1:100, completando con medio Dulbecco. De esta última dilución se tomó lo necesario para tener aproximadamente 0.8 célula en 100 μ l de medio Dulbecco completo (\approx 1 célula por pozo) y se sembraron 48 pozos (la mitad de una microplaca) previamente sembrada con macrófagos. Las multicámaras se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 7% con una humedad relativa del 90%. Se revisaron cuidadosamente los pozos, se detectaron y registraron aquellos en los que se observó claramente la presencia de una sola colonia de células. Las clonas también se re-alimentaron cada tercer día. Cuando las células ocuparon nuevamente 3/4 partes del pozo, se expandieron 5 pozos a pozos grandes (placa de 24) y se volvieron a probar los sobrenadantes por ELISA para corroborar la presencia de anticuerpos anti-amiba. Para la segunda clonación se eligió el hibridoma que dió mejor resultado por ELISA y se procedió como se describió anteriormente. El resto de los cultivos se congeló.

15. Congelación y descongelación de hibridomas.

Para congelar los hibridomas, las células se deben encontrar en buen estado de crecimiento tanto en las multicámaras de 24 pozos como en las botellas de cultivo. Una vez que las células llenaron las 3/4 partes del pozo o de la botella, se despegaron del pozo resuspendiendo suavemente con pipeta Pasteur el fondo (evitando hacer burbujas) y, en el caso de las botellas, por agitación fuerte 5 veces consecutivas. Después, las células se pasaron a un tubo de 15 ml (Falcon, E.U.A.), se tomó una muestra y se contaron; se llenó el tubo con medio Dulbecco y se centrifugaron a 300 x g por 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de células se conservó en hielo. Inmediatamente se preparó una solución de dimetil-sulfóxido (DMSO)(Sigma, E.U.A.) al 10% en medio Dulbecco completo, se mezcló muy bien y se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0.22 μ m. Las

células se resuspendieron suavemente en un volumen adecuado de esta solución, manteniendo el tubo en hielo, se pusieron 2×10^5 o más células por criotubo; luego se colocaron muestras de 1 ml en criotubos de 2 ml (Nunc, Dinamarca), previamente rotulados. Los tubos con las células se almacenaron a -70°C de 4 a 12 h, en un ultracongelador (Forma Scientific, E.U.A.); posteriormente se pasaron a un tanque de nitrógeno líquido para su conservación permanente. La viabilidad de las células congeladas de cada uno de los lotes se verificó, para tener la seguridad de contar con las clonas deseadas en el momento en que se necesitaran.

Para descongelar las células deseadas, cuando menos con un día de anticipación se prepararon multicámaras de 24 pozos o botellas de cultivo de 25 cm^2 con macrófagos. La descongelación se hizo lo más rápidamente posible pasando el tubo del nitrógeno a un baño de 37°C ; ya descongelado, el contenido del tubo se pasó a un tubo cónico de 15 ml y se le adicionó medio Dulbecco para diluir el DMSO, evitando así que las células se dañaran. Las células se centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 min a 4°C y la pastilla se lavó una vez más con medio Dulbecco. Luego, la pastilla se resuspendió en medio Dulbecco completo precalentado a 37°C ; la suspensión celular se sembró en los pozos o en las botellas y se incubó a 37°C , en una atmósfera de CO_2 al 7% y una humedad relativa del 90%. Los cultivos se re-alimentaron cada tercer día; se revisaron los días siguientes para corroborar que las células se hubieran adherido a las superficies y se encontraran creciendo.

16. Obtención a gran escala de anticuerpos monoclonales.

16.1. Crecimiento en masa de hibridomas.

Existen dos maneras distintas de obtener anticuerpos monoclonales a partir de la línea del hibridoma: mediante el crecimiento de la línea en cultivo y mediante el crecimiento de ésta en animales en forma de tumor. El material proveniente del cultivo celular no está contaminado por otros anticuerpos, pero puede ser producido únicamente en pequeñas concentraciones, mientras que el material producido en animales puede estar contaminado con otras inmunoglobulinas, si bien puede ser obtenido en títulos más altos. En términos aproximados, en el líquido ascítico los anticuerpos se encuentran 1000 veces más concentrados que en el sobrenadante de cultivo (Zola, 1987).

MATERIALES Y METODOS

Una vez que las líneas de hibridomas seleccionadas fueron clonadas 2 veces, se pasaron de los pozos de la placa de 24, a botellas de cultivo de 25 cm² (Falcon, E.U.A.). Para obtener el anticuerpo monoclonal a partir del sobrenadante, las líneas de hibridomas simplemente se mantuvieron en cultivo, hasta que alcanzaron a cubrir 3/4 partes de las botellas, momento en el que se colectó el líquido y el cultivo se dividió, se despegaron las células por agitación y se pasó aproximadamente la mitad de las células a otra botella, suplementándolas con medio nuevo. Cuando las células se encontraron en fase log, se pasaron a botellas de 75 cm², con el fin de obtener una mayor cantidad de sobrenadante y se dejaron en estas botellas hasta que el cultivo prácticamente murió, esto con el fin de acumular la mayor cantidad de anticuerpo. El sobrenadante (de un tono amarillento) se colectó en tubos de 50 ml (Falcon, E.U.A.) y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

16.2. Inducción de tumores en ratón.

Para realizar esto, se inyectaron 0.5 ml de Pristano (2, 6, 10, 14-Tetrametilpentadecano, 96%, Aldrich, E.U.A.), por vía intraperitoneal, a ratones machos BALB/c de 1 mes de edad, aproximadamente 10 días antes de la inoculación de los hibridomas. Los hibridomas deseados se sembraron de tal manera que a los 10 días las células se encontraran en fase log, se cosecharon, se centrifugaron, se resuspendieron y se contaron. Las células se lavaron y se resuspendieron en un volumen adecuado de medio Dulbecco, de tal manera que se inmunizaron a cada ratón 5×10^6 células en 1 ml, también por vía intraperitoneal. Se inmunizaron 6 ratones para cada línea celular. Cuando apareció la peritonitis por el tumor, el líquido ascítico se drenó del ratón en condiciones de esterilidad, aproximadamente cada tercer día, dependiendo del tamaño del tumor; para la colecta del líquido ascítico se utilizó una aguja de 18 x 38 mm (Yale, Becton-Dickinson, México), la cual se colocó dentro del abdomen del ratón, éste se sujetó firmemente y se le fue dando masaje, colectando el líquido en un tubo de 15 ml en frío, obteniendo no más de 5 ml por vez para evitar que el animal se descompensara y muriera. En esta forma duraron más tiempo produciendo los anticuerpos monoclonales. El líquido colectado se centrifugó a 360 x g, durante 5 min a 4°C, para eliminar células y material particulado, después se tomó una alícuota para determinar la presencia del anticuerpo esperado por *Western-blot* y el resto del

líquido ascético se conservó a -20°C , hasta ser precipitado con sulfato de amonio (McKearn, 1980).

17. Determinación del isotipo de los anticuerpos.

Como se explicó, los anticuerpos son moléculas heteroméricas, compuestas de cadenas ligeras y pesadas, que contienen cada una de ellas, una región constante y una variable. Las regiones constantes de las cadenas pesadas, comprenden las μ , α , $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, δ , o ϵ , dependiendo de la especie. Las regiones constantes de las inmunoglobulinas, frecuentemente conocidas como isotipos, determinan muchas de las propiedades de la molécula de anticuerpo, incluyendo la solubilidad, propiedades electroforéticas, la fijación del complemento, la unión a los receptores Fc, y la unión a proteínas A y G. Debido a que el isotipo puede influir en el método de purificación, es común determinar los isotipos de los anticuerpos monoclonales u otras preparaciones de anticuerpos específicos como parte de su caracterización inicial. La identificación de los isotipos puede realizarse fácilmente con un *kit* comercial de ELISA, empleando reactivos anti-isotipos (Coligan y col., 1992).

Para determinar el isotipo de los hibridomas obtenidos, se empleó el *kit* de Bio-Rad Laboratories (E.U.A.) Primero, se obtuvieron, cuantificaron e incubaron las proteínas ambiantes totales, como se describió en la sección 9, a microplacas de 96 pozos de fondo plano (Immulon No. 1, Dynatech, E.U.A.) y se colocaron $100\ \mu\text{l}$ ($20\ \mu\text{g}/\text{ml}$) por pozo; se dejó en incubación toda la noche a 4°C . Al día siguiente, se removió cualquier antígeno no pegado enjuagando la placa extensivamente 3 veces con solución amortiguadora salina de fosfatos, pH 7.2 (PBS 0.01 M). Los pozos de la placa se lavaron llenándola con la solución y agitándola por 15 segundos; después se vació el contenido vigorosamente a una tarja. Para prevenir uniones inespecíficas, los pozos de la placa se llenaron con solución bloqueadora (albúmina bovina sérica o leche semidescremada al 1% en PBS) y se dejó incubar durante 45 min; después, se lavó la placa extensivamente 3 veces con solución amortiguadora salina de fosfatos-Tween [$100\ \mu\text{l}$ de Tween 20 (Sigma, E.U.A.) para 200 ml]. Luego, se agregaron las muestras de los hibridomas, líquido de cultivo (sin diluir) o ascites (diluido 1:1000), $100\ \mu\text{l}$ por pozo. La placa se incubó durante toda la noche a 4°C . Después se lavó extensivamente 3 veces con la solución de PBS-Tween. Se agregaron los reactivos del panel

MATERIALES Y METODOS

de anticuerpos de conejo anti-ratón, 100 μ l por pozo y se llenaron las columnas de la A-H con el reactivo del panel respectivo; la placa se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavó extensivamente 5 veces con PBS-Tween. Se agregaron 100 μ l por pozo de conjugado anti-conejo de cabra unido a peroxidasa de rábano, se cubrió e incubó por 1 hora. Pasado este tiempo, se eliminó la solución del conjugado que no reaccionó, con lavados exhaustivos de la placa 4 veces con PBS-Tween y 1 vez con PBS. La solución del sustrato de la peroxidasa [2, 2'-azino-di(3-etil-benzthiazolin sulfonato) y peróxido de hidrógeno] se preparó fresca y se agregaron 100 μ l/pozo; la placa se dejó en incubación por 20 min a temperatura ambiente. Cuando las reacciones positivas fueron evidentes, la placa se colocó en un lector de microplacas (Titertek Plus MS2, ICN Flow, E.U.A.) y se realizó su lectura a 405 nm.

18. Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio.

Para precipitar los anticuerpos monoclonales obtenidos, el sobrenadante de cultivo se centrifugó primeramente durante 30 min, a 20000 x g a 4°C, con el fin de eliminar detritus celulares y material membranoso. La pastilla se eliminó y al sobrenadante se le adicionó el sulfato de amonio (Sigma, E.U.A.), en cristales a una concentración de 291 g/l (50% de saturación), a 4°C con agitación suave; se dejó toda la noche para asegurarse de que precipitara toda la proteína. Al día siguiente, el sobrenadante ya precipitado, se centrifugó por 1 h a 20000 x g, a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se guardó, para probar si quedaron anticuerpos, y la pastilla se disolvió en un volumen mínimo (10-20 ml) de solución amortiguadora de boratos [borato de sodio (borax)(Sigma, E.U.A.) 0.015 M, cloruro de sodio (Merck, México) 0.15 M, pH 8.5] y se colocó en una bolsa de diálisis (Spectrapor, Spectrum Medical Industries, Inc., E.U.A.). Se dializó contra >20 veces el volumen de solución de proteína, con solución amortiguadora de boratos, durante 48 h, con 4-6 cambios. Finalmente, los anticuerpos se colocaron en tubos Eppendorf debidamente rotulados y se conservaron a -70°C.

RESULTADOS

En este trabajo iniciamos el estudio de una proteína de 24 kDa de *E. histolytica* que participa en la relación parásito-célula blanco (Rodríguez y col., 1989). Primeramente, realizamos una caracterización preliminar de esta molécula, antes de llevar a cabo la obtención de anticuerpos monoclonales.

1. Caracterización inmunobloqueada de la p24.

En el laboratorio de la Dra. Esther Orozco se contaba con un antisuero policlonal contra la proteína de 24 kDa, que se había obtenido mediante la inmunización de la molécula en conejos. Este antígeno se había aislado a partir de geles de poliacrilamida-SDS. Iniciamos nuestro trabajo, empleando este antisuero para localizar a la proteína y conocer el número de proteínas que eran reconocidas en geles de poliacrilamida-SDS, en una y dos dimensiones. También en esta parte del trabajo, se determinó si la proteína presentaba carbohidratos en su composición.

1.1. Obtención de proteínas totales de *E. histolytica* y reconocimiento por anticuerpos policlonales anti-p24.

Primeramente obtuvimos las proteínas amibianas totales. Existen varias formas de obtener estas proteínas, nosotros decidimos obtenerlas por dos métodos diferentes, que se encuentran bien estandarizados en nuestro laboratorio. Las proteínas se sometieron a PAGE-SDS y los geles se tñeron con azul de Coomassie. Ambos métodos (1 y 2) nos proporcionaron patrones electroforéticos muy semejantes, aunque se observaron algunas diferencias en varias regiones, una de éstas correspondió a la de 24 kDa. El método de extracción 2, al parecer, solubilizó mucho mejor a las proteínas, ya que en algunas regiones se observó un número mayor de bandas de proteína en donde sólo se observó una con el primer método (Fig. 5 A). Cuando las proteínas obtenidas por los 2 métodos, se transfirieron de un gel de poliacrilamida a un papel de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos policlonales anti-p24, presentaron un patrón de reconocimiento diferente. En las proteínas del método 1, el antisuero reconoció una banda de 24 kDa, mientras que en el segundo

RESULTADOS

método, reconoció dos bandas (Fig. 5 B, carriles 2 y 3). Es importante señalar, que el antisuero policlonal fue generado empleando la proteína de 24 kDa obtenida por el método 1, por lo tanto, se cortó una sola banda. Una de las dos proteínas, obtenida por el método 2, correspondió por migración exactamente a la proteína obtenida por el primer método, mientras que la otra, es de un mayor peso molecular (2 kDa más). Las explicaciones para este resultado pueden ser diversas, quizás el método 2 solubilizó mejor a las proteínas que se encuentran en 24 kDa o probablemente, una de las dos proteínas corresponde a un precursor o a un producto de degradación; inclusive existe la posibilidad de que una de las bandas sea un artefacto de la técnica. También se observó un tenue reconocimiento de otras bandas, debido a reacción cruzada o inespecificidad.

1.2. Determinación del número de proteínas con peso de 24 kDa por electroforesis en geles bi-dimensionales.

Con el fin de determinar el número de proteínas con este mismo peso (24 kDa), reconocidas por el antisuero policlonal anti-p24, se realizaron geles bi-dimensionales, empleando muestras de proteínas totales obtenidas por el método 2, que es donde se identificaron dos bandas (Fig. 6 A). En el mismo gel se corrieron muestras en una y en dos dimensiones. En la Figura 6 panel A, se señalan las dos proteínas que fueron reconocidas por el antisuero policlonal en una dimensión, y en la zona de dos dimensiones se señala la mancha proteica que se encuentra a esa altura. Este gel se transfirió a papel de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpos policlonales anti-p24. En el panel B de la figura se observa el resultado. En una dimensión los anticuerpos reconocieron, como ya se había observado, un doblete de 24 y 26 kDa, pero en la zona de dos dimensiones, en cambio, los anticuerpos reconocieron a una sola proteína. No se detectó alguna otra mancha proteica que correspondiera a la banda de 26 kDa, probablemente porque ésta se encuentra en muy poca cantidad y no fue posible detectarla.

Por lo tanto, el suero policlonal anti-p24, reconoció fuertemente en geles de dos dimensiones una proteína de peso molecular ≈ 24 kDa y con un punto isoeléctrico con una ligera tendencia a ácido (≈ 5.5). Este punto isoeléctrico se determinó en base a patrones obtenidos anteriormente (Rodríguez y col., 1989).

En base a estos resultados, no sabíamos en realidad cuantas proteínas de ≈ 24 kDa eran reconocidas por el anticuerpo policlonal anti-p24, pero pensamos que el método 1 sería mejor para aislar a la proteína de 24 kDa, con el fin de inmunizarla en animales para la obtención de anticuerpos monoclonales. Un suero generado de esta manera contendría a las dos proteínas, en el caso de que se tratara de las dos que se reconocen en proteínas del método 2 en una dimensión. No se inmunizaron las dos bandas porque entonces el trabajo de obtener los anticuerpos se habría duplicado.

1.3. Detección de carbohidratos en la p24.

También era interesante dentro de la caracterización de la proteína, conocer si presenta carbohidratos en su composición, es decir, si es una glicoproteína. Para esto, se utilizaron dos técnicas: una fue la tinción de geles de poliacrilamida por la técnica de PAS, y la otra, empleó una lectina acoplada a la enzima peroxidasa de rábano, la cual fue detectada en ensayos tipo *Western-blot*.

1.3.1. Tinción de PAS.

El resultado de la tinción de un gel de poliacrilamida-SDS por la técnica de PAS se muestra en la Figura 7. Se corrieron las proteínas totales de ameba (método 1) y la p24 kDa electroeluída, a partir de muestras de geles preparativos grandes, en minigeles al 12% (carriles 1 y 2). La proteína electroeluída nos sirvió como control para localizar y verificar que fuera la misma proteína, ya que en los geles teñidos con PAS, los marcadores de peso molecular quedaron demasiado teñidos, por lo que fueron difíciles de distinguir.

Se sabe que la composición de carbohidratos de una glicoproteína constituye una porción baja en toda la molécula, por lo que para lograr un buen nivel de resolución los geles se cargaron con cantidades excesivas tanto de las proteínas totales como de la proteína electroeluída.

La proteína de 24 kDa fue detectada en las dos muestras, lo que nos indicó que se trata de una glicoproteína. También se realizó esta tinción con muestras de proteínas del método 2, sin embargo no se distinguió si se teñieron 1 ó 2 bandas a la altura de 24 kDa (dato no mostrado).

RESULTADOS

Figura 5. Reconocimiento de la proteína de 24 kDa por anticuerpos policlonales anti-p24.

Las proteínas de *E. histolytica* fueron sometidas a electroforesis, transferidas a papel de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos policlonales anti-p24.

Panel A. Gel de PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie.

Carril 1. Marcadores de peso molecular (BRL, E.U.A.).

Carril 2. Proteínas totales (método 1). (25 μ g)

Carril 3. Proteínas totales (método 2). (25 μ g)

Panel B. Inmunoelectrotransferencia.

Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteínas totales (método 1). (25 μ g)

Carril 3. Proteínas totales (método 2). (25 μ g)

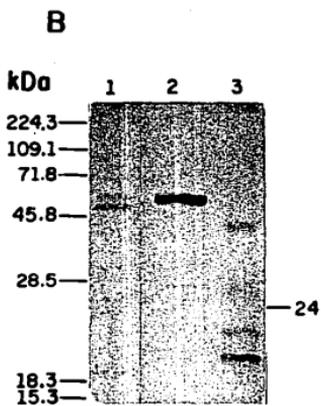
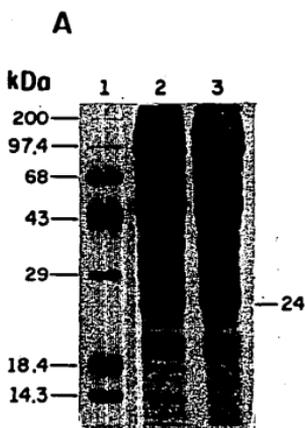


Figura 6. Reconocimiento de anticuerpos policlonales anti-p24 en geles bi-dimensionales.

Las proteínas totales de *E. histolytica* se separaron por electroforesis en geles de dos dimensiones, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos policlonales anti-p24.

Panel A. Gel bi-dimensional de proteínas totales teñido con azul de Coomassie.

Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteínas totales una dimensión (método 2). (60 μ g)

Zona de 2-D. 1.5 mg de proteínas.

Panel B. Inmunoelectrotransferencia.

Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteínas totales una dimensión (método 2). (60 μ g)

Zona de 2-D. 1.5 mg de proteínas.

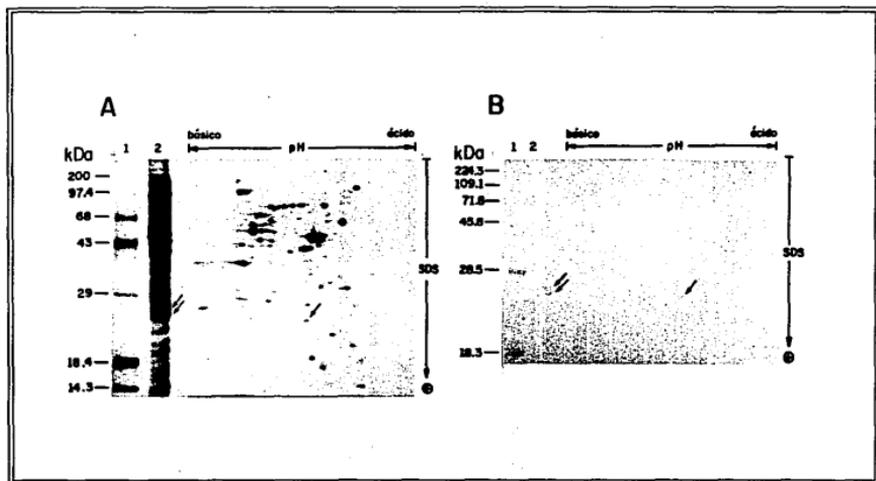


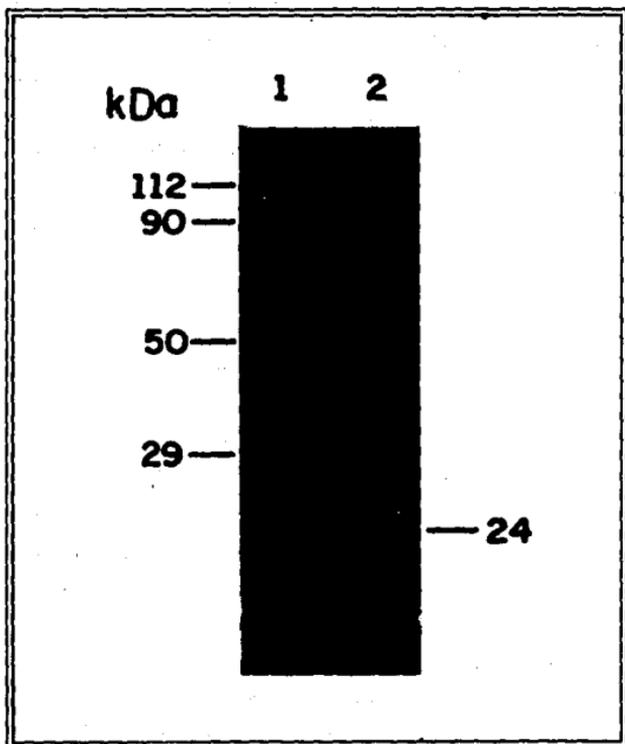
Figura 7. Tinción de PAS.

Se sometieron a electroforesis las proteínas totales de *E. histolytica*, así como la p24 electroeluída y el gel se tiñó por la técnica de PAS.

Gel de PAGE-SDS 12%

Carril 1. Proteínas totales (método 1). (140 μ g).

Carril 2. Proteína de 24 kDa electroeluída. (\approx 10 μ g).



3.2. Reconocimiento por una lectina.

Otra forma para determinar si la proteína de 24 kDa era una glicoproteína fue utilizando una lectina, la WGA acoplada a peroxidasa de rábano. Se corrieron minigeles de poliacrilamida-SDS con proteínas totales amebianas, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se incubaron con la lectina. Como se observa en la Figura 8 A, carril 2, la lectina reconoció varias proteínas de la ameba, entre éstas a la de 24 kDa. En el panel B, se observa que no hubo reconocimiento de la proteína cuando se inhibió la unión de la lectina por un exceso del azúcar *N*-acetil *D*-glucosamina. Aún bajo estas condiciones, se observó el reconocimiento de una proteína de alto peso molecular, muy probablemente correspondiente a la de 220 kDa reportada por el grupo de Rosales-Encina y col., (1987).

Este resultado confirmó la observación anterior, señalando que la proteína de 24 kDa era una glicoproteína, con carbohidratos del tipo de la *N*-acetil-*D*-glucosamina.

2. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-p24.

Como se ha mencionado, el principal objetivo fue la obtención de anticuerpos monoclonales contra la p24. La mayoría de los trabajos reportados sobre anticuerpos monoclonales contra *E. histolytica* han utilizado los trofozoítos completos como antígeno. En nuestro caso, se pretendía obtener los anticuerpos específicamente contra esta molécula y para ello, la estrategia consistió en obtener esta proteína a partir de geles de poliacrilamida-SDS bajo condiciones reductoras. Se inmunizó esta proteína en ratones hasta obtener un título alto de anticuerpos para asegurar el éxito en la fusión con células de mieloma.

2.1. Obtención de la p24.

Primeramente se cultivaron en forma masiva los trofozoítos de la clona A y se extrajeron las proteínas totales siguiendo el método 1. Después, se prepararon varios geles preparativos de poliacrilamida-SDS grandes y se cargaron con estas muestras de proteínas. Al término de las corridas los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se cortó la proteína de 24 kDa, evitando llevarse alguna de las proteínas vecinas. Estas bandas de geles se colectaron y conservaron a -20°C hasta el momento de inmunizarse en ratones. En la Figura 9 panel A, se muestra el tipo de geles a partir de los cuales se aisló la proteína. En el panel

B se observa el resultado de la electroelución de la proteína de 24 kDa, que fue una sola banda de proteína. Este minigel con la proteína electroeluida se transfirió a papel de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpos policlonales anti-p24. En el panel C, se observa que los anticuerpos reconocieron como se esperaba, a la proteína. Estos resultados nos dieron la seguridad de que se estaba cortando una sola banda de proteína. Por lo tanto, se decidió comenzar la inmunización de ratones con esta molécula para obtener células productoras de anticuerpos.

2.2. Esquema de inmunización de la p24.

Antes de comenzar a inmunizar, fue necesario tener un valor aproximado de la cantidad adecuada de proteína, de tal manera que se pudiera obtener una respuesta humoral efectiva en los animales. Para determinar esto, se sometieron a electroforesis en un minigel las proteínas totales de ameba (método 1). Después, este gel se colocó en el adaptador para realizar pruebas de densitometría de un espectrofotómetro de la marca *Beckman*. El resultado se muestra en la Figura 10. Se obtuvieron varios picos que correspondieron a las proteínas separadas. Se midieron las distancias recorridas y se identificó el pico correspondiente a la proteína de 24 kDa. Se realizaron varias comparaciones en peso del pedazo de papel del pico con respecto al resto de los picos, y al obtener un promedio de los valores el resultado fue de 5.34 % para esta molécula. Este dato, aunque indirecto, nos permitió estimar que de los 5000 μg de proteínas totales habían $\approx 150 \mu\text{g}$ de proteína de 24 kDa en un gel preparativo grande. Posteriormente, se calculó el volumen necesario para inmunizar la cantidad de banda equivalente a 50 μg de proteína por ratón.

Con este dato se comenzó a inmunizar a ratones de la cepa BALB/c, cada 15 días, y se realizaron emulsiones 1:1 con adyuvante de Freund.

2.3. Determinación del título de anticuerpos.

Antes de intentar la fusión de células para producir anticuerpos monoclonales era indispensable conocer el título de anticuerpos en los sueros de los animales inmunizados con el antígeno de interés. Mientras se contara con títulos altos de anticuerpos, mayores serían las posibilidades de éxito en una fusión. El título de anticuerpos se determinó de dos

Figura 8. Reconocimiento de la p24 por una lectina.

Las proteínas totales de *E. histolytica* se separaron en gels de PAGE-SDS, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se incubaron con la lectina WGA acoplada a peroxidasa.

Panel A. Inmunoelectrotransferencia de un gel de PAGE-SDS al 12% incubado con la lectina WGA.

Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteínas totales de ameba (método 1). (10 µg).

Panel B. Inmunoelectrotransferencia de un gel de PAGE-SDS al 12% incubado con el azúcar *N*-acetil-D-glucosamina 0.2 M junto con la lectina WGA acoplada a peroxidasa.

Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteínas totales de ameba (método 1). (10 µg).

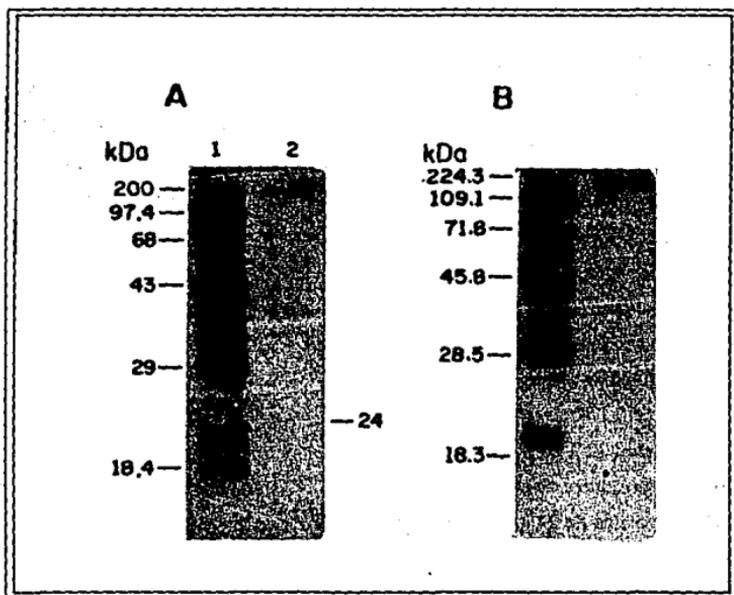


Figura 9. Obtención de la p24.

Para la inmunización de ratones con la p24, se sometieron a electroforesis en geles preparativos grandes a las proteínas totales de *E. histolytica*, se tñeron con azul de Coomassie y se cortó la banda correspondiente a la proteína de 24 kDa. La p24 se electroeluyó de las bandas, se sometió a PAGE-SDS, se transfirió a papel de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpos policlonales anti-p24.

Panel A. Gel preparativo al 12%.

Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteínas totales (método 1). (5 mg).

Panel B. Gel al 12%.

Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteína de 24 kDa electroeluída (5 µg).

Panel C. Inmunoelectrotransferencia del gel anterior.

Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteína de 24 kDa electroeluída (5 µg).

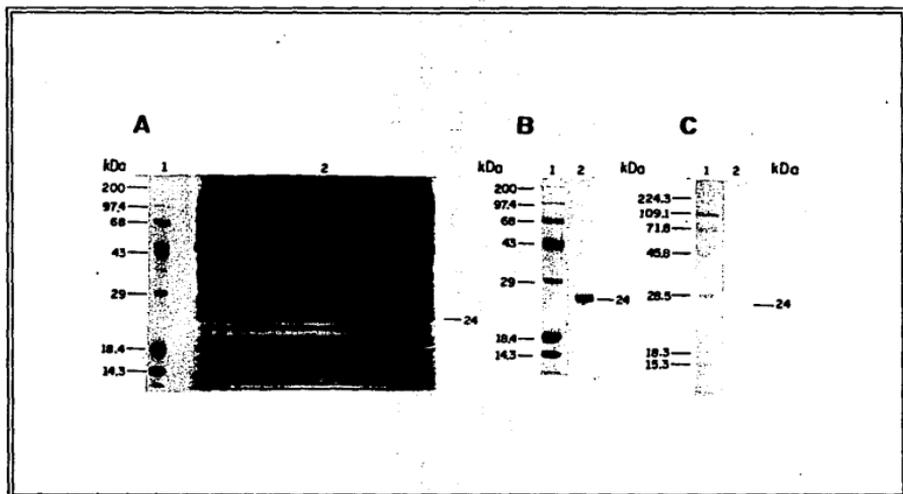
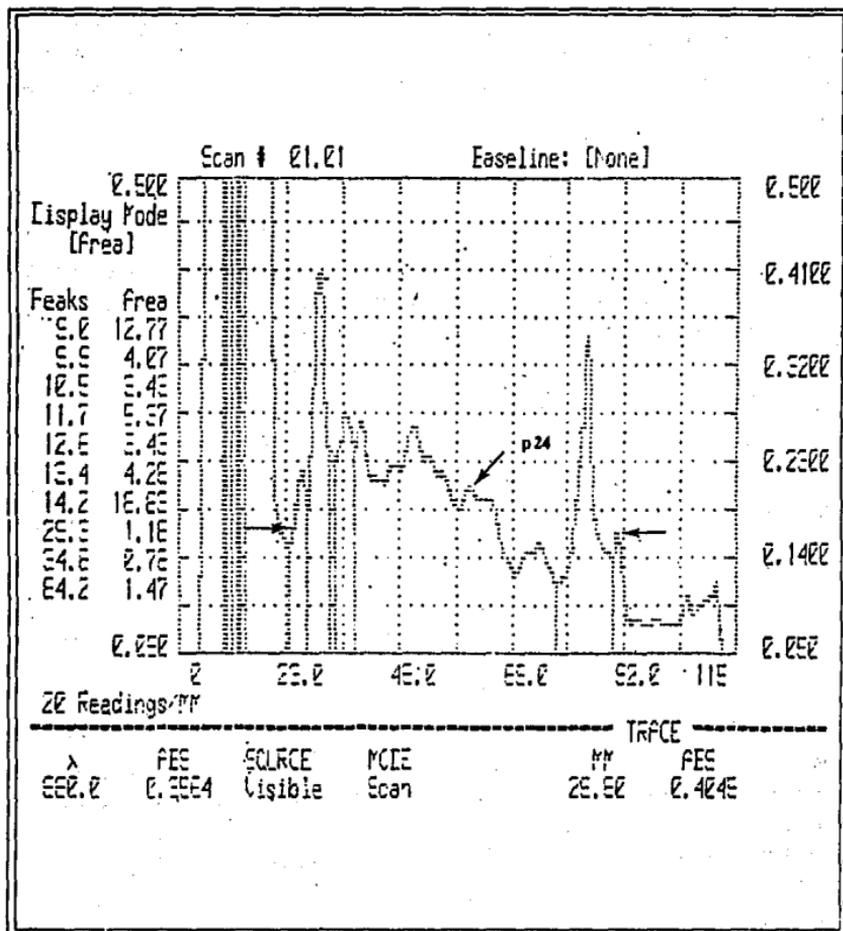


Figura 10. Análisis densitométrico de las proteínas ambientales totales.

Se muestra el barrido a 550 nm de una muestra de proteínas totales de *E. histolytica* (método 1) separadas en un gel de PAGE-SDS al 12%. Se señala el pico correspondiente a la p24, así como el inicio y terminación del gel, los cuales fueron determinados midiendo las distancias correspondientes en el gel.



RESULTADOS

maneras: por ELISA y por ensayos de inmunoelectrotransferencia. Ambas técnicas nos proporcionaron datos semejantes, que nos ayudaron a elegir los mejores candidatos para la fusión.

2.3.1. ELISA.

Los valores de la determinación del título por ELISA se muestran en la Tabla 5. Se incubaron las proteínas totales de amiba obtenidas por el método 1, en microplacas de 96 pozos y se incubaron con diferentes diluciones de los sueros de los ratones inmunizados (por duplicado). Se empleó un segundo anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano y la unión de estos anticuerpos se detectó mediante la reacción con el sustrato ϕ -fenilendiamina. Se realizó la lectura de las reacciones a una longitud de onda de 490 nm en un lector de microplacas y se obtuvo un promedio de las lecturas. Por este método se obtuvieron valores de dilución de entre 1:10000 y 1:15000 (enmarcados), en comparación con los valores del control negativo. El ratón 3 fué el que dió valores más bajos de título por este método; el resto de los ratones presentaron buenos títulos.

Tabla 5. Titulación de los sueros de ratón por ELISA.

DILUCION	RATON 1	RATON 2	RATON 3	RATON 4	RATON 5	RATON 6	CONTROL +
1:500	0.197	0.261	0.101	0.405	0.164	0.292	0.505
1:1000	0.143	0.180	0.078	0.276	0.119	0.189	
1:5000	0.102	0.108	0.053	0.111	0.081	0.079	CONTROL -
1:10000	0.090	0.075	0.051	0.090	0.064	0.067	0.065
1:15000	0.066	0.072	0.057	0.067	0.065	0.067	
1:20000	0.061	0.065	0.050	0.064	0.057	0.056	
1:25000	0.061	0.056	0.049	0.062	0.059	0.056	

NOTA: LOS VALORES DE DESVIACION ESTANDAR NO FUERON MAYORES DE 0.005

2.3.2. Western-blot.

Para analizar mejor el título de los sueros de los ratones, y conocer si reconocían específicamente al antígeno inmunizado, se realizaron ensayos de inmunoelectrotransferencia. Se corrieron minigeles de PAGE-SDS al 12% con proteínas totales de amiba, obtenidas por el método 1, y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Los papeles de nitrocelulosa se cortaron en tiras pequeñas y se incubaron con varias diluciones de los sueros de los ratones inmunizados 3 veces. El resultado se observa en la Figura 11. Aquí, la visualización del reconocimiento fue mejor pues se apreció claramente que los antisueros reconocieron a la proteína de 24 kDa. Por este método se obtuvieron reconocimientos hasta de 1:32000. Los resultados coincidieron con los del ELISA, sugiriendo que los ratones 1, 2, 4, 5 y 6 presentaron una fuerte respuesta inmune humoral contra la proteína de 24 kDa, y por lo tanto, los consideramos buenos candidatos para la obtención de los anticuerpos monoclonales.

2.4. Determinación de la fase logarítmica de crecimiento de la línea de mieloma.

Cuando los ratones alcanzaron títulos altos de anticuerpos (>25000), se preparó la línea celular de mieloma para la fusión con las células de bazo. Para esto, era importante tener a las células de mieloma en fase logarítmica de crecimiento el día de la fusión ya que esto aumentaría las probabilidades de tener híbridos productores de anticuerpos. Para conocer el momento en el que las células se encontraban en ese punto, se realizó una curva de crecimiento. Las células de mieloma se cultivaron con un inóculo inicial, en varias cajas de Petri, y fueron cuantificadas cada 12 horas, durante 5 días. Los valores de conteo de células se muestran en la Figura 12, así como la gráfica que se obtuvo con estos datos.

Para calcular el momento en el que las células se encontraban en fase logarítmica se emplearon los siguientes cálculos:

Primero se determinó el tiempo de división de las células a partir de la expresión:

$$t_D = \frac{0.693 t}{\frac{N}{\ln N_0}}$$

Figura 11. Reconocimiento de los sueros de ratón inmunizados con la p24 por inmunoelectrotransferencia.

Las proteínas totales de *E. histolytica* se sometieron a electroforesis y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. El papel se cortó en tiras, que fueron incubadas con diferentes diluciones de los sueros de los ratones inmunizados 3 veces con la p24.

Carriles 1. Sueros pre-inmunes de cada ratón 1:2000.

Carriles 2. Dilución 1:2000

Carriles 3. Dilución 1:4000

Carriles 4. Dilución 1:8000

Carriles 5. Dilución 1:16000

Carriles 6. Dilución 1:32000

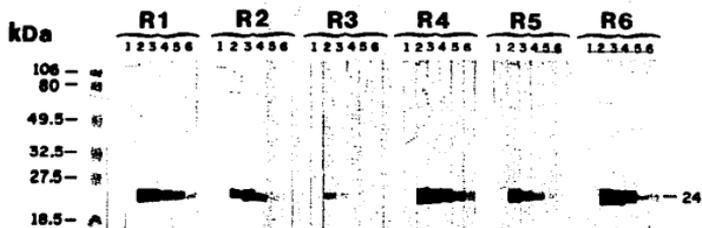
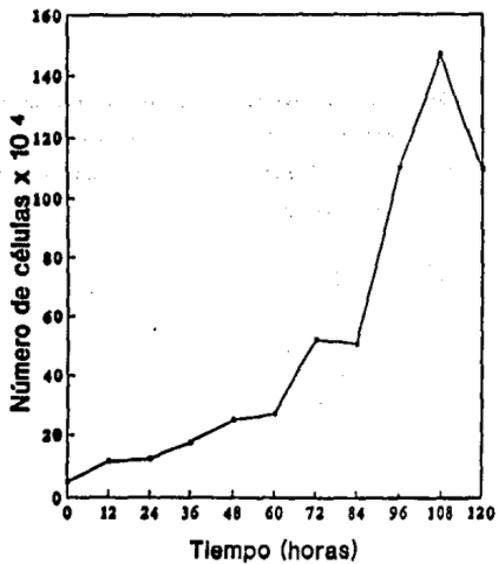




Figura 12. Curva de crecimiento. Línea celular de mieloma.

Se cultivaron 20 cajas de Petri con 50 000 células de mieloma cada una. Cada 12 horas se contó el número de células en 2 de ellas. De los valores obtenidos en las dos cajas se sacó un promedio. Los resultados de los conteos se muestran en la tabla y en la gráfica. A partir de estos valores se determinó la fase logarítmica del cultivo de mieloma.

HORAS	No. DE CELULAS
0	50 000
12	115 000
24	122 000
36	175 000
48	250 000
60	270 000
72	520 000
84	507 000
96	1 099 500
108	1 487 500
120	1 095 000



RESULTADOS

donde

t	= tiempo transcurrido
N_0	= número inicial de células
N	= número final de células
e	= 2.7183

sustituyendo en la ecuación

$$t_D = \frac{0.693 (108 \text{ h})}{\ln \left(\frac{1.467 \times 10^6}{5 \times 10^4} \right)} = \frac{74.84}{\ln 29.35}$$

$$t_D = 22.2 \text{ h}$$

Cuando se conoció el tiempo de división de nuestro cultivo de mieloma, se planeó la fusión con cuatro días de anticipación. Se necesitaban, de acuerdo con el protocolo de fusión, 50 millones de células de mieloma en fase log para ese día. Para conocer el número inicial de células de los cultivos, se empleó el siguiente cálculo:

$$N_0 = \frac{N}{e^{\frac{0.693 t}{t_D}}}$$

$$N_0 = \frac{50 \times 10^6}{0.693 (84 \text{ h})} = 3,633,720 \text{ células.}$$

$$e = 22.2 \text{ h}$$

Se sembraron entonces dos inóculos de mieloma, cada uno con 3.6×10^6 células, en botellas de 75 cm^2 .

También se cultivó un pequeño número de células para probar la eficiencia del medio Dulbecco-HAT. Una botella de cultivo de 25 cm^2 se sembró con células de mieloma en crecimiento continuo y se le adicionaron 7 ml medio Dulbecco-HAT. La población murió totalmente a los 4 días, lo que nos indicó que el mieloma estaba bien sensibilizado a la acción de la aminopterina y que no había células revertantes.

2.5. Fusión celular.

Se realizaron dos fusiones. Una con las células de bazo del ratón #4 y la segunda con las células del ratón #5. Del bazo del ratón #4 se obtuvieron, 37.6×10^6 células y del ratón #5, 38.3×10^6 células. De los dos inóculos sembrados con células de mieloma se obtuvieron del primero 41.5×10^6 células y del segundo 54.3×10^6 células. Las células se fusionaron en una relación 1:1. Los productos de la primera fusión se sembraron en 2 microplacas de cultivo de 96 pozos, mientras que los de la segunda en 3.

2.5.1 Eficiencia de fusión.

De un total de 480 pozos sembrados con células fusionadas, en 219 de ellos se presentó crecimiento de híbridos en el medio de selección HAT. Este número correspondió al 45.6 % de los pozos sembrados (Tabla 6). De estos hibridomas, sólo 11 dieron reacción positiva en las microplacas sembradas con proteínas totales, por ensayos de ELISA. De acuerdo a estos datos, la eficiencia de obtención de hibridomas productores de anticuerpos fue del 5.02% (Tabla 6).

Los 11 hibridomas positivos se expandieron a una microplaca de 24 pozos y de ahí se clonaron por primera vez, congelando una porción de cada uno de los cultivos. La clonación de cada uno se realizó por dilución limitante en la mitad de una microplaca de 96 pozos. Después, se probaron por ELISA los sobrenadantes de cada uno de los pozos en donde se desarrolló una colonia de células, para asegurarnos que fueran monoclonales. Los híbridos positivos se volvieron a expandir, pasando los cultivos de la microplaca de 96 pozos a una de 24. Luego, se clonaron por segunda vez, probando nuevamente por ELISA

Tabla 6. Eficiencia de fusión en la obtención de anticuerpos monoclonales.

EFICIENCIA	RELACION	%
FUSION	219/480	45.6
HIBRIDOMAS POSITIVOS	11/219	5.0

únicamente aquellos híbridos con una sola clona. Finalmente, los hibridomas positivos se expandieron a una placa de 24 pozos y, cuando se contó con suficiente sobrenadante de cultivo, se probaron por inmunoelectrotransferencia. En los diversos pasos de clonación se congelaron varios viales con muestras de células. Toda esta secuencia de clonaciones se esquematiza en la Figura 13.

2.5.2 Eficiencia de clonación.

Todos los hibridomas positivos fueron clonados una vez y sólo algunos, entre ellos los que se reportan al final, fueron clonados dos veces. La eficiencia de clonación osciló entre el 11.8 y el 14 %, es decir, este porcentaje correspondió a los pozos en donde se consiguieron crecimientos con sólo una colonia de hibridomas. La Tabla 7 resume estos valores para los diferentes hibridomas.

La Figura 14 esquematiza el *pedigree* de los tres hibridomas estables que se obtuvieron al final del trabajo de cultivo, que fueron el **D4·4·H6·B10**, el **D5·4·F7·A10** y el **D7·4·H2·B11**.

Después de clonar dos veces a los hibridomas que mejor respuesta positiva dieron, tanto por ELISA como por inmunoelectrotransferencia, se procedió a cultivarlos masivamente y también a propagarlos en forma de tumor en ratones. Para inducir los tumores se inyectaron 5×10^6 células del hibridoma por ratón. De los tres hibridomas, el **D4·4·H6·B10**

Tabla 7. Eficiencia de clonación de híbridomas.

RELACION DE POZOS CON 1 SOLA CLONA				
HIBRIDOMA	1a CLONACION	%	2a CLONACION	%
C4•4	6/48	12.5	—	—
D4•4	6/48	12.5	4/48	8.3
E5•4	4/48	8.3	9/48	18.7
A2•5	7/48	14.5	4/48	8.3
D5•4	13/48	27.0	22/48	45.8
D7•4	8/48	16.6	25/48	52.0
G4•3	2/48	4.1	—	—
A3•5	7/48	14.5	5/48	10.4
E4•3	5/48	10.4	—	—
H4•3	9/48	18.7	—	—
D3•5	—	—	—	—

fue el que mejor indujo tumores en los ratones, ya que se obtuvo una proporción de 4/6; para los otros la proporción fue de 2-3/6.

3. Caracterización de los anticuerpos monoclonales.

Los tres híbridomas estables obtenidos se comenzaron a caracterizar parcialmente, primero determinando su isotipo; después se purificaron y se probaron en ensayos tipo *Western blot*.

3.1. Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales.

Antes de purificar a los anticuerpos monoclonales, se les determinó el isotipo utilizando un *kit* comercial. El resultado de la lectura de la microplaca se muestra en la Tabla 8. Todos los híbridomas resultaron ser de la clase IgM y tener cadenas ligeras de la clase κ (enmarcados). De los híbridomas D5•4•F7•A10 y D7•4•H2•B11 se colocó sobrenadante de cultivo, mientras que del D4•4•H6•B10 se colocó líquido ascítico diluido 1:10000. Este

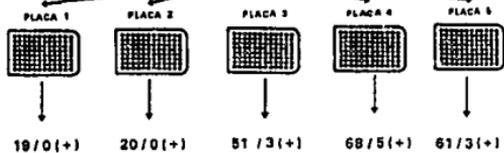
Figura 13. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-p24.

En este esquema se muestran la secuencia de eventos y los datos obtenidos durante el cultivo celular para la obtención de los anticuerpos monoclonales.

Después de la fusión, se indican a la izquierda el número de pozos en donde crecieron híbridos y a la derecha el número de pozos positivos (anti-p24) por ELISA.

En la primera y segunda clonaciones se indican a la izquierda el número de pozos sembrados de cada hibridoma y a la derecha, el número de pozos en donde creció una sola clona. Para la expansión, solamente se eligió de cada hibridoma, la clona que dió los valores más altos por ELISA.

FUSION



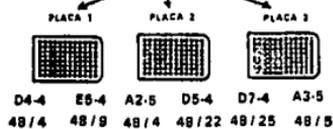
EXPANSION
CONGELACION

1A. CLONACION



EXPANSION
CONGELACION

2A. CLONACION



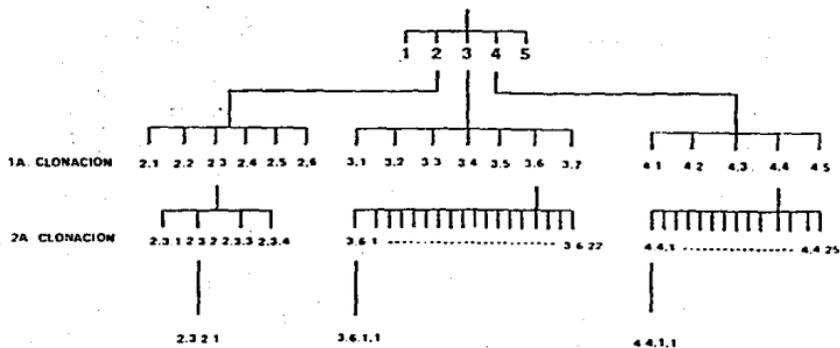
EXPANSION
CONGELACION

CULTIVO

INDUCCION DE TUMOR

Figura 14. Pedigree de los tres híbridomas estables obtenidos.

PLACA #4



CLAVE

- | | |
|------------------------|-------------------------------|
| 2. CLONA PARENTAL D4-4 | 2.3.2.1.HIBRIDOMA D4-4-H6-B10 |
| 3. CLONA PARENTAL D5-4 | 3.6.1.1.HIBRIDOMA D5-4-F7-A10 |
| 4. CLONA PARENTAL D7-4 | 4.4.1.1.HIBRIDOMA D7-4-H2-B11 |

Tabla 8. Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales.

	HIBRIDOMA D5·4·F7·A10	HIBRIDOMA D7·4·H2·B11	HIBRIDOMA D4·4·H6·B10	CONTROL
ANTI-IgG1	0.119	0.194	0.115	0.175
ANTI-IgG2a	0.004	0.024	0.135	0.069
ANTI-IgG2b	0.042	0.062	0.081	0.102
ANTI-IgG3	0.092	0.082	0.189	0.442
ANTI-IgM	1.838	1.642	0.567	0.499
ANTI-IgA	0.036	0.061	0.033	0.074
CADENA KAPPA	0.819	0.772	0.324	0.401
CADENA LAMBDA	0.051	0.070	0.050	0.051

CONTROL: SUERO DE RATON ANTI-p24 (DILUIDO 1:1000).

último reaccionó ligeramente menos fuerte que los demás, pero la lectura de placa nos comprobó que era también de la clase IgM.

3.2. Reconocimiento y título.

La Figura 15 muestra el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales sobre proteínas totales de *E. histolytica*. Se realizó una electroforesis de proteínas totales de amiba obtenidas por el método 1 y el gel se transfirió a papel de nitrocelulosa. Después, éste se cortó en tiras y se incubó con diluciones de los anticuerpos monoclonales ya precipitados con sulfato de amonio. Todos los anticuerpos monoclonales obtenidos reconocieron a la proteína de 24 kDa. Los anticuerpos monoclonales D4·4·H6·B10 y D5·4·F7·A10 presentaron una reacción cruzada con una proteína de \approx 32 kDa.

Los anticuerpos monoclonales D5·4·F7·A10 y D7·4·H2·B11 presentaron un título de hasta 1:100, mientras que el D4·4·H6·B10 tuvo un título de 1:10, por ensayos de inmunelectrotransferencia. Estos anticuerpos fueron purificados de sobrenadante de cultivo.

Por último, se probó la respuesta de uno de estos anticuerpos monoclonales en geles

bi-dimensionales, para tratar de detectar si reconocía a una o dos proteínas, así como a la proteína de 32 kDa, y comparar el resultado con los anticuerpos policlonales anti-p24 (Fig. 7). Se corrió un gel de dos dimensiones con proteínas totales obtenidas por el método 2, se transfirió a papel de nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo monoclonal **D5·4·F7·A10**. Este anticuerpo reconoció una sola banda y mancha de proteína de 24 kDa tanto en una dimensión como en dos, respectivamente (Fig. 16). No se observó reconocimiento alguno ni de la otra banda de 26 kDa ni de la de 32 kDa. La mancha detectada en dos dimensiones se observó mucho más abajo que la que se había detectado con anterioridad (ver Fig. 6).

RESULTADOS

Figura 15. Reconocimiento de los anticuerpos monoclonales sobre las proteínas totales de *E. histolytica*.

Las proteínas totales (método 1) se sometieron a electroforesis y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. El papel se cortó en tiras que se incubaron con los anticuerpos monoclonales.

1. Marcadores de peso molecular.
2. Anticuerpo monoclonal D4·4·H6·B10. Dilución 1:10
3. Anticuerpo monoclonal D5·4·F7·A10. Dilución 1:50
4. Anticuerpo monoclonal D7·4·H2·B11. Dilución 1:50
5. Control (+) suero de ratón anti-p24. Dilución 1:2000.

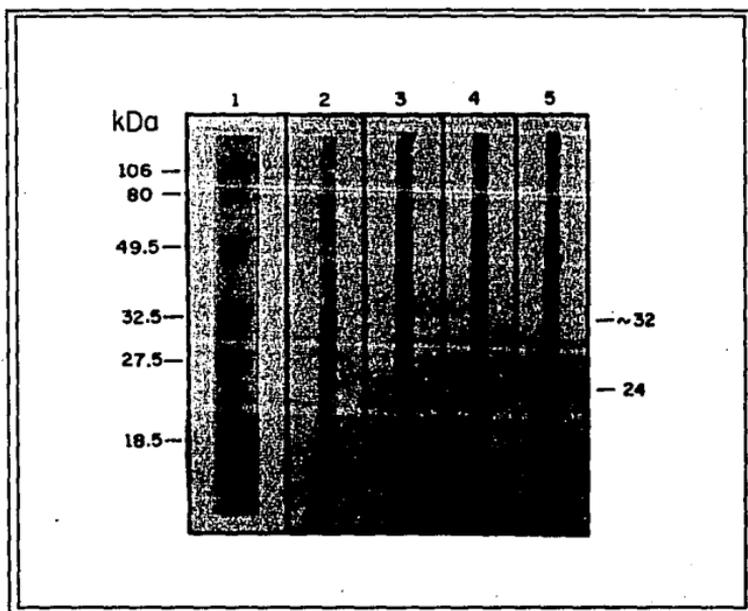


Figura 16. Reconocimiento del anticuerpo monoclonal D5·4·F7·A10 en un gel de 2-D transferido a nitrocelulosa.

Las proteínas totales se separaron por electroforesis bi-dimensional y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. El papel se incubó con el anticuerpo monoclonal **D5·4·F7·A10**.

Panel A. Gel bi-dimensional al 12% teñido con azul de Coomassie.

Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteínas totales (método 2). (60 µg).

Zona de 2-D. 1.5 mg.

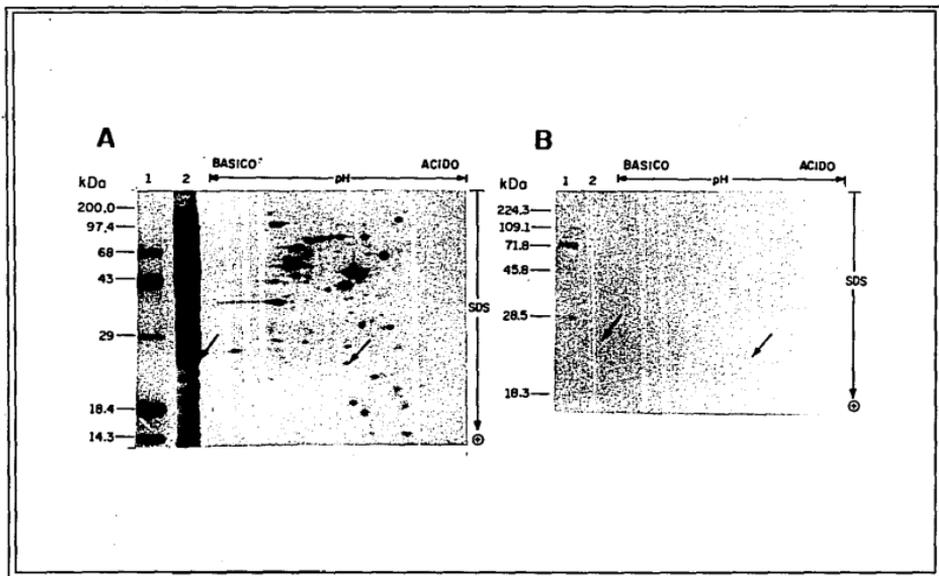
Panel B. Inmunoelectrotransferencia.

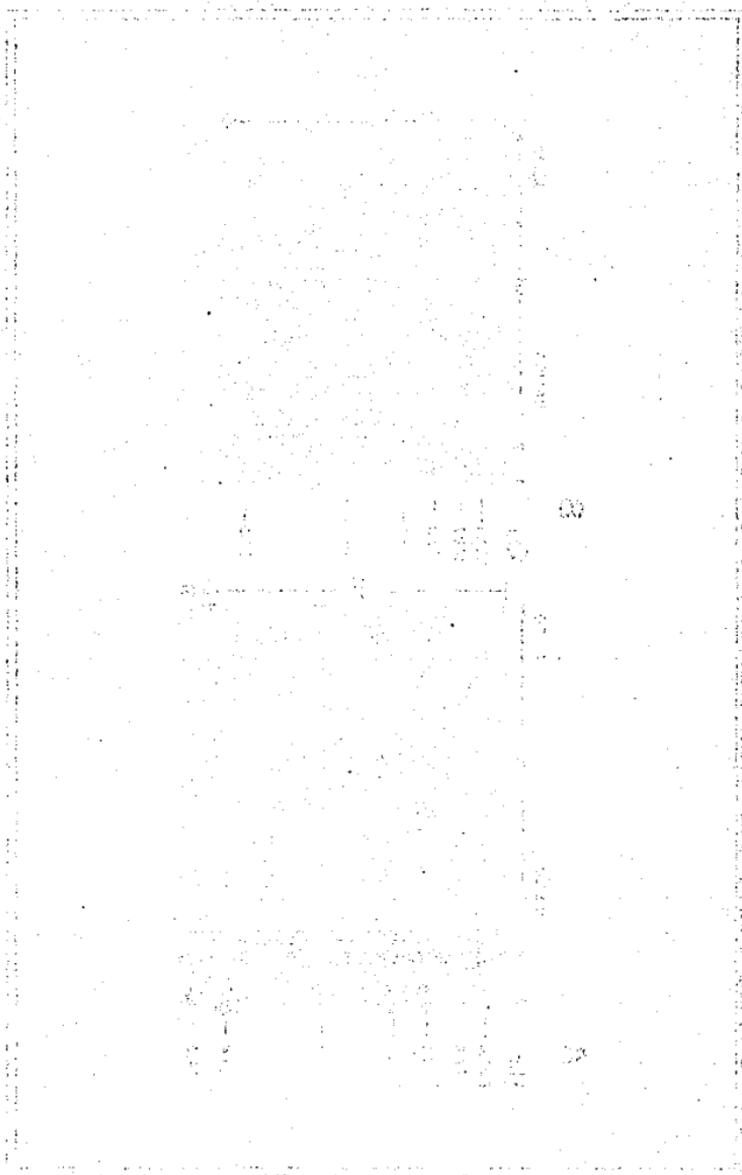
Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Proteínas totales (método 2). (60 µg).

Zona de 2-D. 1.5 mg

Dilución del anticuerpo monoclonal 1:10





DISCUSION

La p24 de *E. histolytica* es una molécula que se adhiere a eritrocitos y cuyos niveles de expresión parecen estar disminuidos en cepas no patógenas de este parásito (Rodríguez y col., 1989; Vargas, 1994).

El grupo de trabajo de la Dra. Orozco se ha propuesto conocer la estructura de esta proteína y determinar el papel que tiene en la relación parásito-célula blanco, al tratar de especificar principalmente si se puede considerar como una adhesina o no. Si su expresión se encuentra modificada en cepas no patógenas de *E. histolytica* y en mutantes deficientes en adhesión, esto nos indicaría que se trata de un antígeno que presenta variabilidad, lo que permitiría emplearlo en inmunodiagnóstico o para ensayos de vacunación. Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, los anticuerpos monoclonales son reactivos importantes que podrían ayudarnos eficazmente para la caracterización estructural y funcional de esta proteína. Hasta donde sabemos, no se han obtenido anticuerpos monoclonales contra la p24 específicamente ni se han determinado cuál o cuáles son los sitios alterados de la molécula en cepas no patógenas.

En base a lo anterior, nuestro objetivo general fue la caracterización inmunobioquímica de la p24 y dentro de ella, la obtención de anticuerpos monoclonales contra esta molécula.

El trabajo se dividió en dos partes principalmente. En la primera se realizó una caracterización preliminar de la p24, mientras que en la segunda, se obtuvieron y caracterizaron parcialmente los anticuerpos monoclonales.

1. Caracterización preliminar de la p24.

Primeramente, se identificó a la p24 con anticuerpos policlonales anti-p24, en muestras de proteínas totales obtenidas por dos métodos diferentes, el método 1 que emplea el inhibidor de proteasas *p*-HMB y el método 2 que utiliza el inhibidor NEM, mediante ensayos tipo *Western blot*. Los anticuerpos policlonales reconocieron en las muestras del método 1 a una proteína de 24 kDa, mientras que en las del 2, detectaron un doblete de 24 y 26 kDa (ver Fig.5). Las explicaciones para este resultado pueden ser varias, empezando

DISCUSION

por las diferencias en los métodos de extracción.

E. histolytica posee varias enzimas con actividad de proteasa, principalmente del tipo de las cisteína-proteasas, aunque también presenta del tipo serina y metaloproteasa (revisadas en Pérez-Montfort y col., 1987; North y col., 1990 y McKerrow y col., 1993). Por lo tanto, los métodos de extracción de proteínas deben adicionar agentes que inhiban o reduzcan la actividad proteolítica de estas enzimas. El método 1 es rápido, emplea el inhibidor de proteasas *p*-HMB, que no es totalmente efectivo, por lo que una vez lisadas las amibas, es necesario hervir la muestra para abolir por completo la actividad autoproteolítica amibiana (Avila y col., 1985). Este método es un lisado crudo sin pasos intermedios de purificación proteica. En cambio el método 2, que es más largo, emplea otro inhibidor de cisteína proteasas -el NEM-, al parecer menos efectivo que el *p*-HMB (Pérez-Montfort y col., 1987); incluye pasos de precipitación (con ácido acético) y separación (centrifugación) de fracciones del lisado amibiano. Además, se adiciona NP-40, un detergente no iónico, que ayuda a solubilizar las proteínas, posiblemente a la p26, mientras que el método 1 no lleva detergentes y por lo tanto no lo hace. Este método permitió una resolución en las bandas que no observamos con el método 1, por ejemplo, a los niveles de 50, 35 y 24 kDa, en geles teñidos con azul de Coomassie (ver Fig. 5a). En conclusión, el método 2 reveló dos bandas polipeptídicas que fueron reconocidas por anticuerpos policlonales anti-p24.

Una de estas dos bandas correspondería por migración a la p24 del método 1. La otra banda pesa \approx 26 kDa. Quizás esta banda podría corresponder a un precursor de la primera. Se sabe que muchos péptidos, glicoproteínas y hormonas se sintetizan como precursores, los cuales son posteriormente procesados. Algunos poseen secuencias cortas (de 15 aminoácidos, pero otros hasta incluso 200) que durante el procesamiento de la proteína se escinden y dan lugar a una proteína funcionalmente madura (Kreil, 1990). Sin embargo, es difícil detectar precursores en un sistema como el que se empleó, porque muchos de los precursores de proteínas se han identificado con el empleo de técnicas altamente sensibles como experimentos de marcaje radioactivo, siguiendo el curso del procesamiento. En una extracción de proteínas se encuentra mayoritariamente el producto maduro y en muy poca cantidad los precursores, pero en el doblete que se identificó ninguna de las bandas parece encontrarse en muy poca cantidad.

Otra explicación al doblete identificado sería que la proteína de menor peso es un producto de degradación de la mayor. Esta degradación sería pequeña puesto que se encuentran muy cercanas las bandas. Es posible que en este método, el NEM no sea totalmente eficaz en la eliminación de la actividad autoproteolítica amibiana. Como se explicó anteriormente, el NEM inhibe la actividad de cisteína-proteasa, pero *E. histolytica* presenta además otras actividades, por lo que es posible que alguna de ellas haya actuado sobre la p24. Si la degradación fuera debida a esto, sería adecuado el empleo de una mezcla de inhibidores que fuera capaz de inhibir la casi totalidad de los grupos de proteasas amibianas. Si se degradara la p24, entonces en realidad en este método pesa ≈ 26 kDa. Es posible también que en el método 1 hayan actuado las otras actividades de proteasa y degradado a la p26.

Si fueran dos proteínas muy relacionadas inmunogénicamente (epítopos compartidos) no se sabría entonces cuál es la que se une a eritrocitos y si se deseaba obtener anticuerpos monoclonales contra la p24, habría sido entonces necesario obtenerlos contra las dos proteínas. Si se tratara de dos proteínas, sería muy probable que se encontraran en la banda del método 1, ya que el antisuero policlonal anti-p24 fue generado cortando esta única banda de geles de poliacrilamida.

Por estas razones, se decidió emplear esta única proteína del método 1 como antígeno para la inmunización de animales.

Con el fin de precisar el número de proteínas reconocidas por anticuerpos policlonales anti-p24, se realizaron geles bi-dimensionales con muestras de proteínas del método 2 y se transfirieron a NC, esperando detectar a las dos proteínas de 24 y 26 kDa. Sin embargo, los resultados no fueron lo suficientemente claros, ya que en muestras de una dimensión los anticuerpos reconocieron el doblete que se había observado con anterioridad, pero en la zona de dos dimensiones reconocieron a una sola mancha de proteína, la que correspondió a la de menor peso (ver Fig. 6). La banda de 26 kDa debe de estar presente, pero por alguna razón no fue detectada por el antisuero policlonal anti-p24. Es posible que sean en realidad varias proteínas con este mismo peso molecular pero en poca cantidad, que escapan a la detección en dos dimensiones con el uso de anticuerpos marcados con peroxidasa. Analizando los geles con azul de Coomassie, se observó una mancha muy tenue a esa altura (ver Fig. 6). La

DISCUSION

detección en los geles se podría mejorar empleando sistemas más sensibles como tinción con plata o radioactividad.

En conclusión, una mancha proteica de 24 kDa se detectó en muestras del método 2 en geles bi-dimensionales por anticuerpos policlonales anti-p24, sin embargo, éstos reconocieron en una dimensión a dos proteínas. La otra banda no se detectó por la razón explicada anteriormente.

Posteriormente, se determinó si esta banda de proteína contiene azúcares. Con el fin de precisar el papel de la p24 en el proceso de la adhesión celular es significativo saber si es una glicoproteína. Se sabe que las glicoproteínas juegan un papel importante en el reconocimiento entre las células, al formar parte de las membranas y dentro de éstas, participar en complejos proteicos con una o más glicoproteínas. Cuando una célula interacciona con un substrato particular (fibronectina, laminina, colágenas, proteoglicanos, etc.) o con ligandos en la superficie de otra célula, la información para decidir si forma un complejo adhesivo o no reside en la arquitectura molecular de estas glicoproteínas; dicha información debe ser transmitida a elementos del citoesqueleto y a otras proteínas de la membrana. Si existe la correcta combinación de señales moleculares, la célula comenzará a formar un complejo de adhesión (Damsky y col., 1984).

En *E. histolytica* se han determinado los tipos de carbohidratos presentes en su superficie, los cuales corresponden a glucosa, manosa, α -metil-manósido, fucosa, maltosa, y lactosa (Ravdin y col., 1985). Las técnicas empleadas para la definición del carácter glicoproteico, tinción de PAS y lectina acoplada a peroxidasa, indicaron que se trata de una glicoproteína. La técnica de PAS únicamente nos indicó que la tinción de bandas fue señal de la presencia de oligosacáridos. La p24 se tiñó por esta técnica, en muestras de proteínas del método 1 así como en muestras de la proteína electroeluida (ver Fig. 7). Este último reconocimiento se observó un poco difuso porque se colocó una muestra grande de proteína. Por otra parte, Joyce y Ravdin (1988) reportaron que la proteína de 24.5 kDa no contiene residuos de manosa, por lo que no es reconocida por la lectina Con A. Rodríguez, en su tesis doctoral observó que la p24 no era reconocida por la lectina Con A pero sí por la WGA, que reconoce residuos de *N*-acetil-D-glucosamina (Rodríguez, 1990). En el presente trabajo, se corroboró este resultado: la lectina reconoció en proteínas totales de *E. histolytica* a la p24

junto con otras 8 proteínas (Fig. 9 A). El reconocimiento no fue muy intenso en todos los casos, a pesar de que se colocó un exceso de proteína, tal vez porque el azúcar representa una porción baja dentro de las moléculas, posiblemente el reconocimiento se mejore si la lectina se emplea más concentrada. Cuando se realizó el experimento de competencia (lectina más *N*-acetil-*D*-glucosamina) la unión de la lectina se inhibió casi por completo, ya que se pudo observar un tenue reconocimiento de algunas proteínas de alto peso molecular (Fig. 8 B). La inhibición total se podría lograr con el uso de concentraciones mayores de *N*-acetil-*D*-glucosamina.

El carácter glicoproteico de esta molécula resultará importante en estudios donde se analice el reconocimiento o no por anticuerpos monoclonales de este tipo de epítomos y más si se deseara estudiar a futuro la capacidad protectora de este antígeno en animales de experimentación, ya que muchas moléculas con esta capacidad, son glicoproteínas. A través del uso del virus vaccinia, como vector de expresión, se han podido obtener varias glicoproteínas recombinantes que han logrado proteger a animales de experimentación y hospederos naturales de algunas infecciones virales como herpes simplex tipo 1 y 2 (Samsonoff y col., 1984; Cremer y col., 1985; Cantin y col., 1987; Wachsmann y col., 1987), fiebre Lassa (Auperin y col., 1988; Fischer-Hoch y col., 1989), rabia (Wiktor y col., 1984; Blancou y col., 1986; Rupprecht y col., 1986) y estomatitis vesicular (Mackett y col., 1985).

2. Anticuerpos monoclonales contra la p24.

Para la obtención de anticuerpos monoclonales, fue necesario estandarizar muchas variables como la fuente de donde se podía obtener el antígeno, la cantidad del mismo, la vía de administración, el esquema de inmunización, la determinación del título de anticuerpos antes de intentar la fusión de células, probar y establecer bien las pruebas por ELISA e inmunoelectrotransferencia, determinar la fase logarítmica de crecimiento del cultivo de mieloma, mejorar la eficiencia de clonación, etc.

Para obtener el antígeno, se pensó en la posibilidad de emplear a la proteína electroeluida (purificada), pero los rendimientos al final del proceso fueron muy bajos y era necesario realizar muchos geles preparativos para obtener las muestras para electroelución

DISCUSION

(Hunkapiller y col., 1983). Si el resultado del reconocimiento de proteínas en geles bidimensionales hubiera quedado claro, se hubiera podido emplear la mancha de proteína separada, aunque también la cantidad de muestra es muy reducida, si bien esta técnica es más fina. Por lo tanto, se empleó el antígeno de geles preparativos grandes de poliacrilamida-SDS, con muestras del método 1 de extracción de proteínas, con el cual se detectó una sola banda de 24 kDa.

Después, fue necesario determinar la cantidad de proteína a inmunizar. El intervalo de antígeno para los ratones se encuentra entre los 10 a 50 μg por animal. Para obtener el dato de la cantidad de proteína en las bandas de los geles de poliacrilamida, se realizó un análisis densitométrico de una muestra de proteínas totales y se determinó el porcentaje que representaba la p24. El resultado que se obtuvo, aunque indirecto, fue de mucha utilidad para realizar los cálculos e inmunizar a cada animal con 50 μg de la p24.

En experimentos preliminares se había probado la inmunización de los animales únicamente con la proteína del gel de poliacrilamida (sin adyuvante), pero los títulos de los sueros por ELISA fueron bajos (datos no mostrados). Entonces se empleó una mezcla del gel de poliacrilamida con adyuvante, la cual fue mucho más efectiva, a juzgar por los resultados de las titulaciones por ELISA e inmunoelectrotransferencia (ver Tabla 5 y Fig. 11).

Con este protocolo de inmunización, después de tres retos se determinó el título de anticuerpos de los animales. Para los ensayos de ELISA, hubiera sido ideal poder incubar en las microplacas como antígeno únicamente a la proteína de 24 kDa; de esta manera se hubieran obtenido unos valores de título mucho más altos por ELISA, porque en las pruebas se incubaron a las proteínas totales. En los ensayos tipo *Western blot*, se observó claramente el reconocimiento de la p24, lo que permitió concluir que el esquema de inmunización había sido efectivo.

Para incrementar las posibilidades de éxito en la obtención de anticuerpos monoclonales, era importante conocer el momento en el que las células de mieloma se encontraban en fase logarítmica de crecimiento. En esta etapa las células se encuentran en óptimas condiciones de cultivo y creciendo a mayor velocidad. El resultado final en horas, fue muy importante ya que ayudó tanto para la fusión como para posteriormente obtener una buena inducción de tumores en los animales.

En lo que respecta a la fusión de las células, se realizó primeramente una fusión con los bazos de los ratones 1 y 6, que presentaron muy buenos títulos de anticuerpos anti-p24. Sin embargo, este intento no tuvo éxito, ya que no hubo crecimiento de híbridos muy probablemente debido a un error en la preparación del PEG. Después, se realizó otra fusión con los ratones 4 y 5. Los animales recibieron en total 5 retos con la p24. De las fusiones se obtuvieron 11 híbridomas parentales y de éstos, 10 se clonaron una vez y solamente 6 se clonaron dos veces. Faltó todavía analizar muchos otros híbridomas, en lo que se conoce como el análisis de selección de variantes.

La clonación de los híbridomas por dilución limitante fue necesaria para evitar que crecieran variables no productoras y principalmente asegurar que los cultivos fueran monoclonales. Para algunos híbridomas, en la primera clonación, observamos que disminuyó la producción de anticuerpos. Esto se puede explicar por los fenómenos de inestabilidad cromosómica, que involucran la pérdida de las cadenas de inmunoglobulinas detectadas en los híbridomas. Una célula diploide de ratón tiene 40 cromosomas; por lo tanto, un híbrido de las dos células tendrá 80 cromosomas inicialmente. Un genoma así es inestable y pierde cromosomas durante los primeros días de cultivo. La pérdida de algunos cromosomas resulta en el cese del crecimiento. Obviamente, la pérdida de los cromosomas involucrados en la síntesis o secreción de las inmunoglobulinas, resulta en híbridos no productores (Kohler, 1980; Zola, 1987). Esta posibilidad siempre está latente, por lo que es recomendable clonar siempre que el título de anticuerpos sea bajo o decaiga. En términos generales, en la segunda clonación los títulos de anticuerpos se incrementaron.

Los anticuerpos monoclonales se pueden comenzar a caracterizar por su especificidad, isotipo, título, afinidad de unión, estabilidad en almacenamiento, etc, antes de ser probados en otros tipos de pruebas.

En lo que respecta a la especificidad, los tres anticuerpos monoclonales obtenidos reconocieron a la p24 en ensayos de inmunoelectrotransferencia. Dos de los anticuerpos monoclonales, el D4·4·H6·B10 y el D5·4·F7·A10, mostraron reactividad cruzada con una proteína de aproximadamente 32 kDa (ver Fig. 16). El primero reconoció más fuertemente a la de 32 kDa, mientras que el otro reconoció principalmente a la de 24 kDa. Esto sugiere que los epítopos reconocidos son diferentes. No se había observado este reconocimiento

DISCUSION

previamente en los sueros inmunes de los animales en los ensayos de *Western blot*. Como se sabe, los anticuerpos monoclonales al reconocer epítotos bien definidos pueden mostrar reactividad cruzada al reconocer secuencias muy parecidas o semejantes en estructura. Es importante mencionar también, que los anticuerpos monoclonales que se obtuvieron pueden o no reconocer a los mismos determinantes antigénicos de la proteína nativa, ya que el antígeno que se inmunizó se obtuvo desnaturalizado. Esto se podría determinar cuando se realicen ensayos con estos anticuerpos *in vivo* o en el reconocimiento de papeles de NC con la proteína nativa.

Dentro de la caracterización de los anticuerpos monoclonales, se determinó su isotipo. Era importante definir el isotipo de los anticuerpos ya que permitiría establecer algunas de sus propiedades, por ejemplo si fijaba complemento o si se unía a proteína A, lo que ayudaría a elegir el método de su purificación. Cuando se determinó el isotipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos, todos correspondieron a la clase IgM. El hecho de que estos anticuerpos pertenezcan a esta subclase y no a otra como la IgG, podría deberse quizás a que están dirigidos contra carbohidratos. Se ha observado que cuando se producen anticuerpos, por ejemplo, contra la pared celular de las bacterias, compuestas de carbohidratos, se obtienen anticuerpos de la clase IgM (Ada, 1992). También es posible que la p24 sea un antígeno independiente de células T. Este tipo de antígenos inducen un tipo de respuesta característica, al ser polímeros que presentan múltiples copias de un epítoto en particular. La unión de este antígeno polimérico a diferentes moléculas de anticuerpos sobre la superficie de las células B es suficiente para estimular a estas células a proliferar y a secretar anticuerpos. Sin embargo, nunca existe una diferenciación de las células y la respuesta humoral presenta todas las características de una respuesta primaria (Harlow y Lane, 1988). También es posible que se haya inducido tolerancia en los animales.

Retomando la cuestión del reconocimiento de 2 bandas de 24 y 26 kDa en las muestras de proteínas del método 2, se probó la respuesta de uno de estos anticuerpos monoclonales, el D5·4·F7·A10, en el reconocimiento en geles bi-dimensionales con las proteínas totales transferidas a nitrocelulosa. Este anticuerpo reconoció una sola banda de proteína en muestras de una dimensión y una sola mancha proteica en la zona de dos dimensiones, la misma que se había observado anteriormente. Esta mancha en dos

dimensiones se observó más abajo del peso de 24 kDa, tal vez debido a las condiciones de corrida de los geles, las proteínas del gel de dos dimensiones migraron más rápido que las de una dimensión. En el reconocimiento en una dimensión, no se detectó el doblete, ni tampoco a la proteína de 32 kDa. Quizás este anticuerpo monoclonal reconoció un epítipo que no está presente en la proteína de 26 kDa. Retomando la interpretación de los resultados anteriores en geles de dos dimensiones pero con anticuerpos policlonales anti-p24, es también posible que la p26 fuera un artefacto de la técnica, que ahora con el uso de un anticuerpo monoclonal desapareció por completo.

3. Perspectivas.

Primeramente, para determinar si son dos proteínas o una se pueden realizar experimentos de mapeo peptídico. Ambas proteínas se pueden cortar de geles de poliacrilamida, electroeluirse y tratarse con enzimas que las corten en fragmentos que se pueden analizar en geles de poliacrilamida y observar el tamaño y número de los fragmentos generados. Posteriormente, estos geles se pueden transferir a nitrocelulosa e incubar con los diferentes anticuerpos tanto policlonales como monoclonales y determinar si el reconocimiento es igual o no.

Los anticuerpos monoclonales tienen muchas aplicaciones como se ha mencionado anteriormente, entre las que destacan el uso para diagnóstico, para la localización de antígenos en tejidos u órganos. (en inmunofluorescencia, marcaje con peroxidasa, etc.), para la caracterización de las proteínas en cepas y clones mutantes en algunas de las propiedades de virulencia de los parásitos, para intentar inducir inmunidad protectora, etc.

Es importante determinar también al principio la naturaleza del epítipo que reconocen los anticuerpos monoclonales, si es carbohidrato o proteína. Esta información determinará su futura aplicación en experimentos.

En *E. histolytica* será importante emplear estos anticuerpos monoclonales en pruebas de inhibición de funciones amebianas como la adhesión, la eritrofagocitosis, el efecto citopático y citotóxico. Los resultados que arrojen estas pruebas nos ayudarán a especificar el papel de la p24 en estos fenómenos, para principalmente, establecer si es una adhesina o no.

DISCUSION

Los anticuerpos monoclonales deberan probarse en ensayos de inmunoelectrotransferencia en proteínas de cepas patógenas y no patógenas, así como en proteínas de mutantes deficientes en adhesión.

Un uso importante de los anticuerpos monoclonales es en el análisis topográfico de las proteínas que reconocen. Este análisis proporciona información sobre la orientación, sitios de unión a ligandos y sitios de unión a carbohidratos. Si la proteína de interés es de membrana, este enfoque resulta mucho más útil. Las proteínas de membrana poseen sitios muy característicos: carbohidratos (siempre extracelularmente), lípidos unidos covalentemente (cerca de la bicapa lipídica) y aminoácidos fosforilados (siempre intracelularmente) (Goding, 1983).

Finalmente, una mezcla de estos anticuerpos monoclonales podría servir para realizar un escrutinio en una genoteca de expresión, construida en un vector como λ gt11 (Young y Davis, 1983), para detectar la secuencia de DNA que codifica para la p24.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en esta tesis se concluyó que:

1. Mediante electroforesis en una y dos dimensiones se determinó que entre las proteínas de *Entamoeba histolytica* existe al menos una proteína de 24 kDa.
2. Esta proteína es una glicoproteína con residuos de *N*-acetil-D-glucosamina, reconocidos por la lectina WGA.
3. Se obtuvieron 11 hibridomas positivos anti-p24, de los cuales 3 se clonaron dos veces. De éstos obtuvimos tres anticuerpos monoclonales que reconocieron a la p24 y dos de ellos presentaron reacción cruzada con una proteína de 32 kDa. Los tres anticuerpos monoclonales pertenecen a la subclase IgM.

... 120 ...

... 120 ...

... 120 ...

... 120 ...

... 120 ...

... 120 ...

... 120 ...

... 120 ...

... 120 ...

REFERENCIAS

- Ada, G.L. (1992). Vaccine antigens. En: *Structure of antigens*. Van Regenmortel, M.H.V. (Ed.). Vol. 1. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A. pp. 380-383.
- Agundis, C., Isibasi, A., Ortiz, V., Reyes, J.L., Paniagua, J., Ramírez, A. y J. Kumate (1990). Obtención de anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas de membrana externa de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 21 (Supl.1): 15-22.
- Andrews, B.J., Mentzoni, L. y B. Bjorvatn (1990). Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 63-65.
- Allason-Jones, E., Mindel, A. y P. Sargeant (1986). *Entamoeba histolytica* as a commensal parasite in homosexual men. *N. Engl. J. Med.* 315: 353-356.
- Arroyo, R. y E. Orozco (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23: 151-158.
- Auperin, D.D., Esposito, J.J. y J.V. Lange (1988). Construction of a recombinant vaccinia virus expressing the Lassa virus glycoprotein gene and protection of guinea pigs from a lethal Lassa virus infection. *Virus Res.* 9: 233-248.
- Aust-Kettis, A. y K.G. Sunsvist (1980). Dynamics of the interactions between *Entamoeba histolytica* and components of the immune response. II. On the distinction of surface-bound and internalized anti-amoeba antibodies. *Scand. J. Immun.* 12: 443-451.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.G. y K. Struhl (Eds.) (1991). *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 2. Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
- Avila, E.E. (1982). Identificación de las proteínas de membrana plasmática y del "cap" inducido por anticuerpo en *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. México, D.F. México.
- Avila, E.E., Sánchez-Garza, M. y J. Calderón (1985). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens* sulphhydryl-dependent proteolytic activity. *J. Protozool.* 32: 163-166.
- Avila, E.E. y J. Calderón (1989). Species-specific and cross reactive antigens of *Entamoeba*. *Int. J. Parasitol.* 19: 949-951.
- Bakker-Grunwald, T. y C. Wöstmann (1993). *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol. Today.* 9: 27-31.

REFERENCIAS

- Barnes, D.R. (1984). *Zoología de los invertebrados*. 4a. Edición. Nueva Editorial Interamericana. México. p.45.
- Barondes, S.H. (1981). Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 207-231.
- Berber, A.C., Escobar, A., Zamora, M. y G. Acosta (1990). Identificación de antígenos de *Entamoeba histolytica* reconocidos por anticuerpos humanos de la clase IgA en suero y calostro de mujeres púerperas por medio de técnicas de inmunotransferencia. *Arch. Invest. Méd. (Méx)*. 21(Supl. 1): 97-101.
- Bhattacharya, A., Ghildyal, R., Bhattacharya, S. y L.S. Diamond (1990). Characterization of a monoclonal antibody that selectively recognizes a subset of *Entamoeba histolytica* isolates. *Infect. Immun.* 58: 3458-3461.
- Bhattacharya, A., Ghildyal, R., Prasad, J., Bhattacharya, S. y L.S. Diamond (1992). Modulation of a surface antigen of *Entamoeba histolytica* in response to bacteria. *Infect. Immun.* 60: 1711-1713.
- Bjerrum, O.J. y C. Schafer-Nielsen (1986). *Analytical Electrophoresis*. M.J. Dunn (Ed.). Verlag Chemie Weinheim.
- Blancou, J., Kieny, M.P. y R. Lathe (1986). Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* 322: 373-375.
- Bos, H.J. (1975). Monoxenic and axenic cultivation of carrier and patients strains of *Entamoeba histolytica*. *Zeit. Parasitkde.* 47: 119.
- Bos, H.J. y A.J. Hage (1975). Virulence of bacteria-associated, *Crithidia*-associated and axenic *Entamoeba histolytica* : experimental hamster liver infections with strains from patients and carriers. *Zeit. Parasitkde.* 47: 79-89.
- Bos, H.J. y R.J. van der Gried (1977). Virulence and toxicity of axenic *Entamoeba histolytica*. *Nature* 265: 341-343.
- Bracha, R., Kobilier, D. y D. Mirelman (1982). Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 36: 396-406.
- Bracha, R. y D. Mirelman (1984). Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobics conditions and metronidazole. *J. Exp. Med.* 160: 353-368.
- Bruchhaus, I., Brattig, N.W. y E. Tannich (1992). Recombinant expression, purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 23: 27-29.

- Burnet, F.M. (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Austral. J. Sci.* **20**: 67-69.
- Calderón, J. y R. Tovar-Gallegos (1980). Loss of susceptibility to antibody and complement mediated lysis in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* **1**: 241-244.
- Calderón, J., Muñoz, M.L. y H.M. Acosta (1980). Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoeba*. *J. Exp. Med.* **151**: 184-193.
- Calderón, J. y E.E. Avila, (1986). Antibody-induced caps in *Entamoeba histolytica*: isolation and electrophoretic analysis. *J. Infect. Dis.* **153**: 927-932.
- Cantin, E.M., Eberle, R., Baldick, J.L., Moss, B., Willey, D.U., Notkins, A.L. y H. Openshaw (1987). Expression of herpes simplex virus glycoprotein B by a recombinant vaccinia virus and protection of mice against lethal herpes simplex virus 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 5908-5912.
- Cavalier-Smith, T. (1991). Archamoeba: the ancestral eukaryotes? *Biosystems* **25**: 25-38.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* **57**: 953-994.
- Chávez, A., Iturbe-Alessio, I., Segura, M. y D. Corona (1974). Fagocitosis a eritrocitos humanos por *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* **3**: 275.
- Clark, C.G. y L.S. Diamond (1993). Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: arguments against convertibility. Abstracts of the Fogarty International Center Conference on host-parasite relationships in amebiasis. Sept. 8-10. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.
- Coffino, P., Baumal, R., Laskov, R. y M.D. Scharff (1972). Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants. *J. Cell Physiol.* **79**: 429-440.
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. y W. Strober (Eds.) (1992). *Current Protocols in Immunology*. Vol. 1. Current Protocols, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, U.S.A.
- Corliss, J.O. (1987). Protistan phylogeny and eukaryogenesis. *Inter. Rev. Cytol.* **100**: 319-370.
- Cook, G.C. (1980). *Tropical gastroenterology*. Oxford university press, Oxford. G.B. pp 158-164, 381-393.

REFERENCIAS

- Cook, G.C. (1990). *Parasitic disease in clinical practice*. The Bloomsbury series in clinical science. Springer-Verlag. London. G.B. pp 103-112.
- Cotton, R.G. y C. Milstein (1973). Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature* 244: 42-43.
- Cremer, K.J., Mackett, M., Wohlenberg, C., Notkins, A.L. y B. Moss (1985). Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science* 288: 737-740.
- Damsky, H.C., Knudsen, K.A. y C.A. Buck (1984). Integral membrane glycoproteins in cell-cell and cell-substratum adhesion. En: *The biology of glycoproteins*. R.J. Ivatt (Ed.). Plenum Press. New York and London. pp 1-4.
- de Lalla, F., Rizzardini, G., Cairoli, G.A., Rinaldi, E., Santoro, D. y A. Ostinelli (1988). Outbreak of amoebiasis in tourists returning from Thailand. *Lancet* ii: 847.
- Despommier, D.D. y J.W. Karapelou (1987). *Parasite life Cycles*. Springer-Verlag. New York, U.S.A. pp 22-23.
- Deutsch, K. y V. Zaman (1959). An electron microscopic study of *Entamoeba invadens* (Rodhain, 1934). *Exp. Cell. Res.* 17: 310-319.
- Diamond, L.S., Phillips, B.P. e I.L. Bartgis (1974). A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* in hamster liver. *Arch. Inv. Med. (Méx)*. 5 (Supl.2): 423-426.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R. y C.C. Cunnick (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72: 431-432.
- Diamond, L.S. y C.G. Clark (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Euk. Microbiol.* 40: 340-344.
- Dunbar, B.S. (1987). *Two dimensional electrophoresis and Immunological techniques*. Plenum Press, New York, U.S.A. p.131.
- Edman, U., Meraz, M.A., Rausser, S., Agabian, N. y I. Meza. (1990). Characterization of an immunodominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 172: 879-888.
- Elsdon-Dew, R. (1968). The epidemiology of amoebiasis. *Adv. Parasitol.* 6: 1-62.

- Engvall, E. y P. Perlman (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-879.
- Estrada, I.C. (1992). Nuevos enfoques en la obtención de vacunas. En: *Vacunas, Ciencia y Salud*. Escobar, A., Valdespino, J.L. y J. Sepúlveda (Eds.). Secretaría de Salud. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. México. pp 107-128.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. y D.F.H. Wallach (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2624.
- Fazekas de St. Groth, S. y D. Scheidegger (1980). Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*. 35: 1-21.
- Feingold, C., Bracha, R., Wexler, A. y D. Mirelman (1985). Isolation, purification and partial characterization of an enterotoxin from extracts of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* 48: 211-218.
- Fisher-Hoch, S.P., McCormick, J.B. y D. Auperin (1989). Protection of rhesus monkeys from fatal Lassa fever by vaccination with a recombinant vaccinia virus containing the Lassa virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 317-321.
- García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E. y G. Guarneros (1982). Aislamiento de clones de *E. histolytica* deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. *Arch. Inves. Med. (Méx)* 13 (Supl. 3): 129-136.
- Gharidian, E. y E. Meeroovitch (1979). Pathogenicity of the axenically cultivated *Entamoeba histolytica*, strain NIH:200 in the hamster. *J. Parasitol.* 65: 768-771.
- Gitler, C. y D. Mirelman (1986). Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 237-261.
- Goding, J.W. (1983). *Monoclonal antibodies: principles and practice*. Academic Press, London, England. pp 1-46, 56-91, 134-136.
- Goding, J.W. y E. Handman (1984). Electrophoretic analysis of protein antigens. En: *Genes and Antigens of Parasites. A laboratory manual*. C.M. Morel (Ed.). 2nd edition. UNDP/WORLD BANK/WHO & Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil. pp 404-409.
- González-Ruiz, A., Haque, R., Rehman, T., Aguirre, A., Jaramillo, C., Castañón, G., Hall, A., Guhl, F., Ruíz Palacios, G., Warhurst, D.C. y M.A. Miles (1992). A monoclonal antibody for distinction of invasive and noninvasive clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2807-2813.

REFERENCIAS

- Greaves, M.F. (1975). *Cellular recognition*. Chapman & Hall. London.
- Guerrant, R.L., Brush, J., Ravdin, J.I., Sullivan, J.A. y G.L. Mandell (1981). The interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear leukocytes. *J. Infect. Dis.* **143**: 83-89.
- Gutiérrez-Trujillo, G. (1980). Características principales de la amibiasis invasora en el niño. Actualización de algunos conceptos clínicos y epidemiológicos. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. **11** (Supl. 1): 281-286.
- Harlow, E. y D. Lane (1988). *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A. p.47.
- Hood, L.E., Weissman, I.L., Wood, W.B. y J.H. Wilson (1984) *Immunology*. 2nd Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California. pp 21-39.
- Horibata, K. y A.W. Harris (1970). Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp. Cell. Res.* **60**: 61-77.
- Hunkapiller, M.W., Lujan, E., Ostrand, F. y L.E. Hood (1983). Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *Meth. Enzymol.* **91**: 227-236.
- Joyce, P. y J.I. Ravdin (1988). Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**: 74-80.
- Kabnick, K.S. y D.A. Peattie (1991). *Giardia*: a missing link between prokaryotes and eukaryotes. *Amer. Sci.* **79**: 34-43.
- Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B. y K. Rajewsky (1979). A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**: 1548-1550.
- Keene, W.E., Pettit, M.G., Allen, S. y J. McKerrow (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **163**: 536-549.
- Keene, W.E., Hidalgo, M., Orozco, E. y J. McKerrow (1989). Evidence that a secreted thiol proteinase mediates the cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. Abstracts of the joint SCB/AJBMB meeting, San Francisco, CA., U.S.A.
- Khyse-Andersen, J. (1984). *Biochem. Biophys. Meth.* **10**: 203.

- Kieny, M.P., Blancou, J., Lathe, R., Pastoret, P.J., Soulebot, J.P., Desmetre, P. y J.P. Lecocq (1988). Development of animal recombinant DNA vaccine and its efficacy in foxes. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 799-802.
- Knoll, A. H. (1992). The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science* **256**: 622-627.
- Kobiler, D. y D. Mirelman (1980). Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* **29**: 221-225.
- Köhler, G. (1980). Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 2197-2199.
- Köhler, G. y C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- Kreil, G. (1990). Processing of precursors by dipeptidylaminopeptidases: a case of molecular ticketing. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 23-25.
- Kretschmer, R., Collado, M.L., Pacheco, M.G., Salinas, M.C., López-Osuna, M., Lecuona, M., Castro, E.M. y J. Arellano (1985). Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol.* **7**: 527-544.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leippe, M. (1992). Membrane perforation by *Entamoeba histolytica*: structural implications derived from the sequence of the pore-forming peptide. *Arch. Med. Res.* **23**: 35-37.
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O. L., Horstmann, R.D. y H.J. Müller-Eberhard (1991). Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7659-7663.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich III, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y F.G. Wallace (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* **27**: 37-58.
- Liddell, J.E. y A. Cryer (1991). *A practical guide to monoclonal antibodies*. John Wiley & Sons. England. pp 68-69.
- Littlefield, J.W. (1964). Selection of hybrids from mating of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* **145**: 709-710.

REFERENCIAS

- Long-Krug, S.A., Fisher, K.G., Hysmith, R.M. y J.I. Ravdin (1985). Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*. Description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.* **152**: 536-541.
- López, J.S., Jensen, F.J., Mendoza, F. y L. Ortiz-Ortiz (1982). Anticuerpos monoclonales contra *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx)* **13** (Supl.3): 291-295.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fair, A.L. y R.J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Luaces, A.L. y Barrett, A.J. (1988). Affinity purification and biochemical characterization of histolisin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* **250**: 903-909.
- Lundbland, G., Huld, G., Elander, M., Lind, J. y K. Slettergreen (1981). N-acetylglucosaminidase from *Entamoeba histolytica*. *Comp. Biochem. Physiol (B)*. **68**: 71-76.
- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Loadholt, C.B. y F. E. Pittman (1979). Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **139**: 9-17.
- Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Hofbauer, A.F. y F.E. Pittman (1981). Sequential histopathology of cavitory liver abscess formation induced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*. **11** (Supl.1): 163.
- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F., Kairalla, A.A., Cantey, J.R. y F.E. Pittman (1984a). Relationship of citotoxins of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* to virulence. *Gastroenterology* **86**: 1488-1495.
- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F. y F.E. Pittman (1984b). Proteinase activities of *Entamoeba histolytica* cytotoxin. *Gastroenterology* **87**: 17-27.
- Lynch, E.C., Rosenberg, I.M. y C. Gitler (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* **1**: 801-804.
- Mackett, M., Yilma, T., Rose, J.K. y B. Moss. Vaccinia virus recombinants: expression of VSV genes and protective immunization of mice and cattle. *Science* **227**: 433-435.
- Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M. y D. Chapman (Eds.) (1990). *Handbook of Protozoista. The structure, cultivation, habitats and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants and fungi*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, U.S.A. p.XI.
- Martínez-Baez, M. (1989). Introducción histórica. En: *Amibiasis*. Martínez-Palomo, A. (Ed.) Editorial Médica Panamericana. México, D.F. México. pp 11-16.

- Martínez-Palomo, A. (1978). Inducción de inmunidad protectora antiamebiana con "nuevos antígenos" en el hámster lactante. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 9 (Supl.1): 321-324.
- Martínez-Palomo, A. (1982). *The biology of Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. Jonh Wiley & Sons Ltd. Sussex. England. pp 5-59.
- Martínez-Palomo, A. (1986). Biology of *Entamoeba histolytica*. En: *Amebiasis*. Martínez-Palomo, A. (Ed.). Amsterdam Elsevier Biomedical. pp 11-43.
- Martínez-Palomo, A. (1987). The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol. Today* 3: 111-118.
- Maurelli, A.T., Blackmon, B. y R. Curtiss III (1984). Temperature-dependent expression of virulence genes in *Shigella* species. *Infect. Immun.* 43: 195-201.
- McGowan, K., Deneke, C.F., Thorne, G.M. y S.L. Gorbach (1982). *Entamoeba histolytica* cytotoxin; purification, characterization, strain virulence and protease activity. *J. Infect. Dis.* 146: 616-624.
- McKearn, T.J. (1980). Methods for the production and characterization of monoclonal antibodies (appendix). En: *Monoclonal antibodies hybridomas: a new dimension in biological analyses*. R.H. Kennett, T.J. McKearn y K.B. Bechtol (Eds.). Plenum Press, New York and London. p. 374.
- McKerrow, J.H., Sun, E., Roshenthal, P. J. y J. Bouvier (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 821-53.
- Mendoza, F., Ximenez, C., Díaz de León, L. y L. Ortiz-Ortiz (1985). Traducción de ARN obtenido de *Entamoeba histolytica* y su caracterización con un anticuerpo monoclonal específico. *Salud Pública Méx.* 27: 241-245.
- Merino, E., Glender, W. del Muro, R. y L. Ortiz-Ortiz (1990) Evaluation of the ELISA test for the detection of *Entamoeba histolytica* in feces. *J. Clin. Lab. Anal.* 4: 39-42.
- Meza, I., Cázares, F., Rosales-Encina, J.L., Talamás-Rohana, P. y M. Rojkind. (1987). Use of antibodies to characterize a 220 kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 156: 798-805.
- Milstein, C. (1980). Monoclonal antibodies. *Sci. Amer.* 243: 66-74. (Octubre).
- Mirelman, D. (1987). Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.* 51: 272-284.

REFERENCIAS

- Mirelman, D., Feingold, C., Wexler, A.M. y R. Bracha (1983). Interactions between *Entamoeba histolytica*, bacteria and intestinal cells. En: *The cytopathology of parasitic diseases*. Kelliot y Whollao (Eds.). Pitman Medical Press, London.
- Mirelman, D., Bracha, R., Wexler, A. y A. Chayen (1986). Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization. *Infect. Immun.* 54: 827-832.
- Mirelman, D., Karen, Z. y R. Bracha (1992). Cloning and characterization of an antigen detected on membrane surfaces of non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 23: 49-53.
- Mirelman, D., Eichenbaum, Z., Nuchamowitz, Y., Stolarsky, T. y R. Bracha (1993). Arguments in favour of convertibility of *Entamoeba histolytica*. Abstracts of the Fogarty International Center Conference on host-parasite relationships in amebiasis. Sept. 8-10. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.
- Muller, F., Franz, A. y E. Werries (1988). Secretory hidrolases of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* 35: 291-295.
- Muñoz, M.L., Calderón, J. y M. Rojkind (1982). The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 155: 42-51.
- Muñoz, M.L., Rojkind, M., Calderón, J., Tanimoto, M., Arias-Negrete, S. y A. Martínez-Palomo (1984). *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *J. Protozool.* 31: 468-470.
- Muñoz, O. (1989). Epidemiología de la amibiasis. En: *Amibiasis*. Martínez-Palomo, A. (Ed.). Editorial Médica Panamericana. México, D.F. México. p. 164.
- North, M.J., Mottram, J.C. y G.H. Coombs (1990). Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol. Today.* 6: 270-275.
- Nossal, G.J.V. y J. Lederberg (1958). Antibody production by single cells. *Nature* 181: 1419-1420.
- Odumeru, J.A., Wiseman, G.M. y A.R. Ronald (1984). Virulence factors of *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 43: 607-601.
- O'Farrel, P.H. (1975). High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.

- Okada, Y. (1962). Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp. Cell. Res.* 26: 98-107.
- Olgún, T. (1984). *Estudio comparativo de la fagocitosis en dos clones de Entamoeba histolytica de diferente virulencia*. Tesis de Licenciatura en Biología. ENEP-Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. México.
- Orozco, E. (1981). *Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica*. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. México, D.F. México.
- Orozco, E., Martínez-Palomo, A. y G. Guarneros (1980). Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 11 (Supl.1): 153-157.
- Orozco, E., Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Guarneros, G. y J. Mora Galindo (1982). Las interacciones lectina-receptor median la adhesión de *Entamoeba histolytica* a células epiteliales. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 13(Supl.3): 153-157.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A. y T. Sánchez (1983). *Entamoeba histolytica*: phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.* 158: 1511-1521.
- Ortiz-Ortiz, L., Ximenez, C., Mendoza, F., Michalak, C., Melendro, E.I. y A. Oliva (1986). *Entamoeba histolytica*: specific antigen recognized by a monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* 61: 390-397.
- Osada, M. (1959). Electron microscopic studies on protozoa. I. Fine structure of *Entamoeba histolytica*. *K.J. Med.* 8: 99.
- Oyama, V.I. y H. Eagle (1956). Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin Ciocalteu). *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 91: 305.
- Pérez-Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velazquez-Medina, L., Montfort, I. e I. Becker (1987). Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 26: 87-98.
- Pérez-Tamayo, R. (1989). Patología de la amibiasis. En: *Amibiasis*. Martínez-Palomo, A. (Ed.). Editorial Médica Panamericana. México, D.F. México. p. 42.
- Pérez-Tamayo, R. y H. Brandt (1971). *Pathology of protozoal and helminthic diseases*. Williams y Wilkins (Eds.). Baltimore, U.S.A.

REFERENCIAS

- Petri, Jr., W.A., Chapman, M.D., Snodgrass, T., Mann, B.J., Broman, J. y J.I. Ravdin (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **264**: 3007-3012.
- Petri, W.A., Jr., Snodgrass, T.L., Jackson, T.F., Gathiram, V., Simjee, A.E., Chadee, K. y M.D. Chapman (1990a). Monoclonal antibodies directed against the galactose binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. *J. Immunol.* **144**: 4803-4809.
- Petri, W.A., Jr., Jackson, T.F.H.G., Gathiram, V., Kress, K., Saffer, L.D., Snodgrass, T.L., Chapman, M.D., Keren, Z. y D. Mirelman (1990b). Pathogenic and Nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect. Immun.* **58**: 1802-1806.
- Petri, W.A., Jr. y J.I. Ravdin (1991). Protection of Gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **59**: 97-101.
- Phillips, B.P., Diamond, L.S., Bartigis, I.L. y S.A. Stuppler (1972). Results of intracecal inoculation of germfree and conventional guinea pigs and germfree rats with axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* **19**: 498-499.
- Phillips, S.C., Mildvan, D. y D.C. Williams (1981). Sexual transmission of enteric protozoa and helminths in a venereal-disease-clinic population. *N. Engl. J. Med.* **305**: 603-606.
- Pinto da Silva, P., Martínez-Palomo, A. y A. González-Robles (1975). Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate. *J. Cell. Biol.* **64**: 538-550.
- Pollock, R.R., Teillaud, J.L. y M.D. Scharff (1984). Monoclonal antibodies: a powerful tool for selecting and analyzing mutations in antigens and antibodies. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**: 389-417.
- Potter, M. y C.R. Boyce (1962). Induction of plasma cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil adjuvants. *Nature* **193**: 1086-1087.
- Prasad, R., Tola, M., Bhattacharya, S., Sharma, M.P. y A. Bhattacharya (1992). Recognition of *Entamoeba histolytica* lipophosphoglycan by a strain-specific monoclonal antibody and human immune sera. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**: 279-87.
- Ravdin, J.I. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* **8**: 247-260.
- Ravdin, J.I. (Ed.) (1988). *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica*. John Wiley and Sons, U.S.A. p.838.

- Ravdin, J.I. (1989). *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. *J. Infect. Dis.* **159**: 420-429.
- Ravdin, J.I., Croft, B.Y. y R.L. Guerrant (1980). Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **152**: 377-390.
- Ravdin, J.I. y R.L. Guerrant (1981). Role of adherence in the cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*: study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **68**: 1305-1313.
- Ravdin, J.I., Murphy, C.H., Guerrant, R.L. y E.L. Hewlett (1985). Effect of calcium and phospholipase A antagonists in the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **156**: 542-549.
- Ravdin, J.I., Petri, W.A., Murphy, Ch. F. y R.D. Smith (1986). Production of mouse monoclonal antibodies which inhibit *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* **53**: 1-5.
- Ravdin, J.I., Petri, Jr., W.A. y D. Mirelman (1988). Mechanisms of adherence by *Entamoeba histolytica*. En: *Amebiasis. Human infection by Entamoeba histolytica*. Ravdin, J.I. (Ed.). John Wiley & Sons, U.S.A.
- Reed, S.L., Sargeant, P.G. y A.I. Braude (1983). Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 248-253.
- Reed, S.L., Flores, B.M., Batzer, M.A., Stein, M.A., Stroher, V.L., Carlton, J.E., Diedrich, D.L. y B.E. Torian (1992). Molecular and cellular characterization of the 29-kilodalton peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica*: differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infect. Immun.* **60**: 542-549.
- Rodríguez, M.A. (1990). *Proteínas y genes que participan en la interacción de Entamoeba histolytica con la célula blanco*. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología Molecular). Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. México, D.F. México.
- Rodríguez, M.A. y E. Orozco (1986). Isolation and characterization of phagocytosis and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **154**: 27-32.
- Rodríguez, M.A., Hernández, F., Santos, L., Valdez, A. y E. Orozco. (1989). *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**: 87-100.

REFERENCIAS

- Rosales-Encina, J.L., Meza, I., López de León, A., Talamás-Rohana, P. y M. Rojkind (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **156**: 790-797.
- Rosenblatt, H.M., Parikh, N., McClure, J.E., Meza, I., Hwo-Sy, Bryan, J. y W.T. Shearer (1985). Mitogen-like monoclonal anti-actin antibodies. *J. Immunol.* **135**: 995-1000.
- Rupprecht, C.E., Wiktor, T.J., y D.H. Johnston (1986). Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 7947-7950.
- Samsonoff, C., Mercer, S.R. y D. Panicali (1984). Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 193-197.
- Sanger, F. y E.O.P. Thompson (1953). The amino acid sequence in the glycol chain of insulin. *Biochem. J.* **53**: 353-374.
- Sargeant, P.G. (1992). '*Entamoeba histolytica*' is a complex of two species. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**: 348.
- Scholze, H. y E. Werries (1984). A weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **11**: 293-300.
- Schulz, T.F., Kollaritsch, H., Hengster, P., Stemberger, H., Scheiner, O., Wideman, G. y M.P. Dierich. (1987). Molecular analysis of *Entamoeba histolytica* antigens recognized by IgG and IgM antibodies in the sera of patients with amoebiasis. *Trop. Med. Parasitol.* **38**: 149-52.
- Schuster, F.L. (1990). Phylum Rhizopoda. En: *Handbook of Protozoista. The structure, cultivation, habitats and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants and fungi*. Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonia, M. y D. Chapman (Eds.). Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, U.S.A. pp 3-18.
- Sepúlveda, B. (1980). Amoebiasis: Host-pathogen biology. *Rev. Infect. Dis.* **4**: 1247.
- Shibl, A.M. (1985). Effect of antibiotics on adherence of microorganisms to epithelial cell surfaces. *Rev. Infect. Dis.* **7**: 51-65.
- Smith, H. (1978). The determinants of microbial pathogenicity. En: *Assays in microbiology*. Norris, J.R. y M.H. Richmond (Eds.). John Wiley & Sons. Chichester, N.Y. U.S.A.

- Sogin, M.L. (1989). Evolution of eucaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Amer. Zool.* 29: 487-499.
- Spice, W.M. y J.P. Ackers (1992). The amoeba enigma. *Parasitol. Today.* 8: 402-406.
- Stanley, Jr., S.L., Becker, A., Kunz-Jenkins, C. y L. Foster (1990). Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4976-4980.
- Strömqvist, M. y H. Gruffman (1992). Periodic acid/Schiff staining of glycoproteins immobilized on a blotting matrix. *BioTechniques* 13: 744-746.
- Tachibana, H., Kobayashi, S., Kato, Y., Nagakura, K., Kaneda, Y. y T. Takeuchi (1990). Identification of a pathogenic isolate-specific 30,000 Mr antigen of *Entamoeba histolytica* by using a monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 58: 955-960.
- Tachibana, H., Kobayashi, S., Nagakura, K., Kaneda, Y. y T. Takeuchi (1991). Reactivity of monoclonal antibodies to species-specific antigens of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* 38: 329-334.
- Tanimoto, M., Sepúlveda, B., Vázquez-Saavedra, J.A. y L. Landa (1971). Lesiones producidas en el hígado de hámster por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axénico. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 2 (Supl. 1): 275-284.
- Tannich, E., Bruchhaus, I., Walter, R.D. y R.D. Horstmann (1991). Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49: 61-72.
- Torian, B.E., Lukehart, S.A. y W.E. Stamm (1987). Use of monoclonal antibodies to identify, characterize and purify a 96,000 dalton surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 156: 334-343.
- Torian, B.E., Flores, B.M., Stroehrer, V.L., Hagen, F.S. y W.E. Stamm. (1990). cDNA sequence analysis of a 29 kDa cystein-rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6358-6362.
- Towbin, H., Staehelin, Th. y J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Trissi, D., Martínez-Palomo, A., De la Torre, M., De la hoz, R. y E. Pérez de Suárez (1978). Surface properties of *Entamoeba histolytica*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.* 148: 1137-1145.

REFERENCIAS

- Trissl, D. (1983). Glycosidases of *Entamoeba histolytica*. *Z. Parasitenkd.* **69**: 291-298.
- Tsutsumi, V., Mena López, R., Anaya-Velázquez y A. Martínez-Palomo (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* **117**: 81-91.
- Tsutsumi, V., Canales Treviño, L. y A. Martínez-Palomo (1992). Inmunoprofilaxia de la amibiasis. En: *Vacunas, Ciencia y Salud*. Escobar, A., Valdespino, J.L. y J. Sepúlveda (Eds.). Secretaría de Salud. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. México. pp 521-527.
- Udezulu, I.A. y G.J. Leitch (1987). A membrane-associated neuraminidase in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* **55**: 181-186.
- Ungar, B.L., Yolken, R.H. y T.C. Quinn (1985). Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in fecal specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 465-472.
- Vargas, M.A. (1994). *Variabilidad fenotípica y genotípica en Entamoeba histolytica: el efecto modulador del medio y su relación con la virulencia*. Tesis de Doctorado en Ciencias (Patología Experimental). Departamento de Patología Experimental. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N. México, D.F. México.
- Vinayak, V.K. y R.K. Shandil (1990). Recognition of 29 kDa surface-associated adhesive molecule of *Entamoeba histolytica* by monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Immunol.* **64**: 169-178.
- Vincent, P. y R.A. Neal (1960). Duration of invasiveness of *Entamoeba histolytica* maintained *in vitro*. *Parasitol.* **50**: 449.
- Vohra, H., Kaur, S., Wangoo, A., Ganguly, N.K. y R.C. Mahajan (1992a). Inhibition of target cell adhesion by monoclonal antibody to the 66 kD surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Infection* **20**: 279-82.
- Vohra, H., Kaur, S., Ganguly, N.K. y R.C. Mahajan (1992b). Inhibition of adhesion by monoclonal antibody to 66 kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **23**: 235-237.
- Wachsman, M., Aurelian, L., Smith, C.C., Lipinskas, B.R., Perkus, M.E. y E. Paoletti (1987). Protection of guinea pigs from primary and recurrent herpes simplex virus (HSV) type 2 cutaneous disease with vaccinia virus recombinants expressing HSV glycoprotein D. *J. Infect. Dis.* **155**: 1188-1197.
- Waldmann, T.A. (1991). Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* **252**: 1657-1662.

- Walsh, J.A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8: 228-238.
- Walsh, J.A. (1988). Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. En: *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica*. Ravdin, J.I. (Ed.). John Wiley and Sons. U.S.A. pp 93-105.
- Warner, J.R. y Ch. Gorenstein (1977). The synthesis of eucaryotic ribosomal proteins *in vitro*. *Cell* 11: 201-212.
- Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. y A.M. Weiner (1987). *Molecular Biology of the gene*. 4th. Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California, U.S.A. pp 837-845.
- Weries, E., Nebinger, P. y A. Franz (1983). Degradation of biogenic oligosaccharides by β -N-acetylglucosaminidase secreted by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 7: 127-140.
- Wiktor, T.J., MacFarlan, R.I. y K.J. Reagan (1984). Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 7194-7198.
- Wittner, M. y R.M. Rosenbaum (1970). Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19: 755.
- Wonsit, R., Thammapalard, N., Tharavanij, S., Radomyos, P. y D. Bunnag (1992). Enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal and policlonal antibodies for the detection of *Entamoeba histolytica* antigens in faecal specimens. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 166-169.
- Woodrow, G.C. (1990). An overview of biotechnology as applied to vaccine development. En: *New generation vaccines*. Woodrow, G.C. y M.M. Levine (Eds.). New York, Marcel Dekker, Inc. pp. 31-41.
- Ximenez, C., Mendoza, F., Michalak, C., Melendro, E.I., Oliva, A. y L. Ortiz-Ortiz (1985). Caracterización inmunológica de un anticuerpo monoclonal específico para *E. histolytica*. *Salud Pública Méx.* 27: 235-240.
- Ximenez, C., Sosa, O., Leyva, O., Morán, P., Melendro, E.I. y M. Ramiro. (1992). Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86: 121-127.
- Yelton, D.E. y M.D. Scharff (1981). Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 657-80.

REFERENCIAS

- Young, J.D., Young, T.M., Lu, P.L., Unkeless, J.C. y Z.A. Cohn (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **156**: 1677-1690.
- Young, R.A. y R.W. Davies (1983). Efficient isolation of genes by using antibodies probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 1194-1198.
- Zola, H. (1987). *Monoclonal antibodies: a manual of techniques*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 23-61.

APENDICE
1. Medio de cultivo para *E. histolytica*. (TYI-33) (Diamond y col., 1978).

Biosate	30.0 g
Glucosa	10.0 g
NaCl	2.0 g
KH ₂ PO ₄ (anhidro)	0.6 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1.3 g
L-Cistefina	1.2 g
Acido ascórbico	0.2 g
Citrato férrico de amonio	0.02 g
H ₂ O (desionizada) c.b.p.	870 ml

pH 6.8

2. Medio de cultivo (completo) para hibridomas.

Medio DMEM (alta glucosa) (Gibco No. de Catálogo 430-2800EB)	100.0 ml
Suero fetal bovino	20.0 ml
Glutamina (200 mM)	1.0 ml
Glicina (0.15 mM)	0.2 ml
2-Mercaptoetanol (0.01 M)	0.5 ml
Fungizona (250 µg/ml)	0.1 ml
Penicilina/Estreptomcina (10,000 u/100 ml; 10,000 µg/ml)	0.5 ml

CHAPTER 1

1.1.1. The first part of the book is devoted to the study of the

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a las siguientes personas:

A la Dra. Marfa Esther Orozco Orozco, por permitirme trabajar en su laboratorio, por su paciencia, confianza y apoyo constantes, para la realización de este trabajo. Por el ejemplo que como persona y científico representa para mí.

Al Dr. Manuel Hernández Hernández, de la unidad de reactivos inmunológicos y anticuerpos monoclonales, del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN, por brindarme su tiempo para escuchar mis dudas, por sus comentarios y sugerencias, fundamentales para el trabajo, que me hicieron comprender mejor la técnica para producir anticuerpos monoclonales.

Al Profesor Antonio Lazcano-Araujo, del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por motivarme hacia la investigación y por toda la biología que aprendí en sus cursos y en su laboratorio.

A los miembros del jurado:

·Dra. Sara Frías Vázquez

(Laboratorio de Genética, Instituto Nacional de Pediatría)

·M. en C. Gabriela García Pérez

(Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN)

·Q.F.B. Fernando Ramos Reyes

(Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM) y

·Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

(Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM)

por aceptar ser parte del jurado, por sus comentarios, sugerencias y observaciones para mejorar el trabajo. No obstante, soy el único responsable de los errores que hayan permanecido.

A la M. en C. Guillermina García Rivera, por todo lo que aprendí trabajando junto a ella, por haberme enseñado la mayor parte de las técnicas para la obtención de los anticuerpos, pero sobre todo, por brindarme su amistad y compañerismo inigualables.

A la Q.F.I. Antonia Avila Flores, por brindarme su mano siempre que mis ánimos decaían, por escucharme siempre que sentía estar sólo, por su infinito apoyo cuando los días fueron muy oscuros y también, por todo lo que aprendí a su lado en el laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio: Dra. Deborah Lazard, Dr. Mario A. Rodríguez, Dr. Miguel Angel Vargas, Dra. Rosaura Hernández, Dr. Marco Antonio Sánchez, Dra. Patricia Ayala, Dr. Juan Pedro Luna, M. en C. Marfa Eugenia Hidalgo, M. en C. Dulce Delgadillo, M. en C. Ismael Vázquez, M. en C. Lúcia Feitosa, Prof. Christine Rigother, Dr. Luis Miguel Salgado, QFB Margarita Leyva, Biól. Llanela Gamboa, QBP Eduardo Flores, QBP Tomás Sánchez, Biól. Consuelo Gómez, Biól. Guillermo Pérez, QBP Margarita Guaderrama, M. en C. Marcela Báez-Camargo, M. en C. Leobardo Mendoza, Téc. Alejandrina Reyes y Téc. Salvador Chavarría, por enseñarme muchas cosas, por ser mis maestros, por su crítica para mejorar el trabajo y el manuscrito, por la amistad y compañerismo que me han brindado, por contribuir a mi formación como investigador y como persona.

A los Biólogos Fernando Medina y Carlos Cruz, del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV, por compartir amablemente algunos reactivos para los experimentos de fusión de células.

A la Dra. Rossana Arroyo, del Departamento de Microbiología de la Universidad de Texas, en San Antonio, por sus valiosos comentarios para la obtención de los anticuerpos monoclonales.

A la Dra. Iris Estrada, del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, por concederme su tiempo y escuchar mis dudas de inmunología y por sus valiosas aportaciones a la comprensión de mis resultados.

A la Dra. Rosa María del Angel, del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV, por permitirme trabajar mis cultivos de hibridomas en su laboratorio, cuando en el nuestro no fue posible.

A los compañeros de los laboratorios 10 (Entomología molecular) y 8 (Virología) del Departamento de Patología Experimental, por brindarme su apoyo y altruismo cuando los necesité.

A los compañeros del Departamento de Fotografía del CINVESTAV, por su ayuda y cooperación que tuvieron para conmigo.

También deseo expresar mi agradecimiento:

A mis amigas y amigos: Diana Millán, Rosalinda Tapia, Emma Saavedra, José Luis Busto, Greco Hernández, David Olivares, Fernando Lledías, Armando García y Alfonso Bautista, por la amistad, las experiencias, su influencia y los buenos momentos que hemos compartido.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Ciencias de la UNAM: Raquel Ortega, Ana María Velasco y Renato Capello por su amistad y el apoyo que me han dado.

A todos mis familiares: tíos, tías, primos y primas, de las familias García y Liévana, así como a mi madrina Silvia Martha Calderón. Agradezco especialmente a mi tío: Dr. Celso García, Ing. César García y Lic. Cuauhtémoc García por todo el gran apoyo y confianza que me han brindado durante toda mi vida. Mi gratitud para todos es inexpressable e inolvidable.

A Stephen Jay Gould, por enriquecer a través de su lectura esta visión de la vida.

A mi Facultad y

A mi Universidad.