

TESIS DE DOCTORADO

11281  
1  
2g

PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL  
CONTRA LA PROTEINASA AMIBIANA DE 30 kDa CON UN ESTUDIO  
SOBRE SOBRE LESIONES AMIBIANAS IN VIVO E IN VITRO

QUE PRESENTA

INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER

Para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA INMUNOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

México D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El trabajo de esta tesis fue realizado en el  
Departamento de Medicina Experimental, Facultad de  
Medicina, bajo la tutoría del Dr. Ruy Pérez Tamayo

A LA MEMORIA DE MI MADRE

A MI PADRE

A MI ESPOSO RUY Y MIS HIJOS RUY, DANIEL Y SEBASTIAN

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Ruy Pérez Tamayo y a la Dra. Montfort que me hayan llevado a este nivel de mi formación académica.

Al Dr. Armando Pérez la ayuda que hizo posible este trabajo.

A las Sritas. Lucía Alvarez y Aida García por su excelente apoyo secretarial y su disposición para ayudar en todo.

A mis compañeros Ricardo Vargas, Leonor García, Augusto González, Alfonso Olivos, Pedro Balderas y Eusebio Tello por su gran colaboración a lo largo del trabajo.

Al Sr. Tomás Cruz por su excelente trabajo fotográfico.

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	6
<b>INTRODUCCION</b>	8
1 Definición de la enfermedad	8
2 Datos epidemiológicos mundiales y mexicanos	10
3 Destrucción tisular: mecanismos moleculares	10
4 Proteinasas en general	12
5 Proteinasas de <i>E. histolytica</i>	13
6 Lisosomas y localización de las proteinasas	20
7 Objetivos de la tesis	23
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	24
1 Antígeno	24
2 Producción del anticuerpo monoclonal (mAb)	24
a) Fusión y cultivo celular	25
b) Selección de hibridomas por ELISA	26
c) Clonación y expansión de hibridomas	27
d) Purificación e isotipo del mAb	29
3 Naturaleza del epítipo reconocido por el mAb	29
a) Inmunoelectrotransferencias (Western blot)	29
b) Inmunoprecipitado (Mr, actividad proteolítica por zimograma, en azocaseína)	31
c) Inhibición de proteólisis por mAb	34
d) Colagenolisis por el inmunoprecipitado	35
4 Inmunolocalización de la proteinasa	37
a) Inmunofluorescencia <i>in vitro</i>	37
b) Inmunoperoxidasa <i>in vivo</i>	38
c) Inmuno-oro ultraestructural	39
5 Efecto del mAb sobre la actividad citopática de <i>E. histolytica</i>	42
<b>RESULTADOS</b>	44
1 Antígeno	44
2 Producción del mAb	44
3 Naturaleza del epítipo reconocido por el mAb	44
a) Inmunotransferencias	44
b) Inmunoprecipitaciones	45
c) Inhibición de proteólisis por el mAb	45
d) Colagenolisis por el inmunoprecipitado	46
4 Inmunolocalización	46
a) Inmunofluorescencia <i>in vitro</i>	47

b) Inmunoperoxidasa <i>in vivo</i>	47
c) Inmuno-oro ultraestructural	47
5 Efecto del mAb sobre la actividad citopática	50
<b>Discusión</b>	52
<b>Bibliografía</b>	58
<b>Figuras</b>	
1	67
2	68
3	69
4	71
5	72
6	74
7	76
8	78
9	81
10	83
11	87

## RESUMEN

Se produjo un anticuerpo monoclonal contra una proteinasa de cisteína de 30 kDa de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS. Se analizó la especificidad del anticuerpo contra la proteinasa amibiana mediante pruebas de inhibición específica de la digestión de azocaseína de una fracción purificada conteniendo la proteinasa y por análisis electroforético del antígeno purificado por el anticuerpo en presencia de dodecíl sulfato de sodio. Para determinar a cual de las proteinasas mayores pertenece el epítotope reconocido por el anticuerpo monoclonal, se probó si la enzima inmunoprecipitada era capaz de digerir colágena nativa (tipo I) de tendón de rata. El resultado fue positivo y la actividad proteolítica fue inhibida por E-64 (un inhibidor específico de proteinasas de cisteína) y activada por 1-10 fenantrolina (un inhibidor de metaloproteinasa y activador de proteinasas de cisteína). Con este resultado se propone que el anticuerpo monoclonal reconoce un epítotope de "amebapaina" (o bien uno compartido por "amebapaina" e "histolisina").

Se tiñeron los trofozoitos con el anticuerpo monoclonal para inmunofluorescencia. Se encontró heterogeneidad en la intensidad y la localización de la fluorescencia tanto en la célula íntegra como en la distribución subcelular. La misma heterogeneidad de la tinción a nivel subcelular se observó en los trofozoitos localizados en abscesos hepáticos experimentales, teñidos con métodos

convencionales de inmunohistoquímica. Se hizo un análisis de inmuno-oro ultraestructural de trofozoitos amibianos y se encontró marcaje en zonas amorfas, claras, sin membranas delimitantes visibles. También se observó algo de marcaje en la zona fibrogranular, en vesículas y en la membrana plasmática. Los resultados indican, que por lo menos una de las proteinasas mayores de cisteína en *E. histolytica* está localizada en un compartimiento citoplásmico translúcido a electrones. Después de la eritrofagocitosis se observa que las proteinasas de los trofozoitos se translocan de este compartimiento a vesículas fagocíticas, lo cual sugiere que estos organelos amorfos pudieran ser equivalentes de lisosomas en la amiba, una célula eucariótica primitiva. Se analizó el efecto del mAb 4D-6 sobre la actividad citopática amibiana. Los trofozoitos HM1-IMSS desprenden grandes áreas de una monocapa de células en cultivo de la línea MDCK. Este efecto citopático fue inhibido parcialmente por el mAb, y en mayor grado por el inhibidor de proteasas de cisteína E-64.

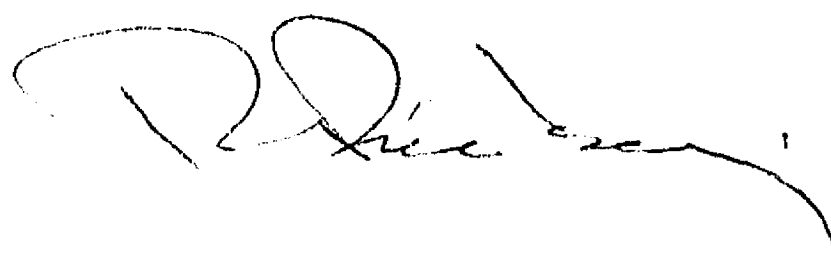


## SUMMARY

We produced a monoclonal antibody (mAb) against a major cysteine proteinase of 30 kDa from trophozoites of *E. histolytica* strain HM1:IMSS. The specificity of the mAb was confirmed by specific inhibition of azocasein digestion and by electrophoretic analysis, in the presence of sodium dodecyl sulfate or on a substrate gel, of the antigen precipitated by the antibody. Since the immunoprecipitated enzyme was able to digest native rat tail tendon collagen (type I) and the activity was inhibited by the cysteine proteinase inhibitor E-64 and activated by the metalloproteinase inhibitor 1-10 phenanthroline, we assumed the mAb recognized an epitope of "amebapain" or one shared by "amebapain" and "histolysin".

Immunofluorescent staining of trophozoites with the mAb revealed heterogeneity in the intensity of whole cell fluorescence and subcellular localization of the stain. The latter was also observed in trophozoites in experimental liver abscesses in hamsters, that were stained by conventional immunohistochemical methods. Ultrastructural analysis showed antigen distributed mainly in clear amorphous zones in the cytoplasm that were not limited by a visible membrane. Proteinases are translocated from these compartments to phagocytic vacuoles after trophozoites

ingest red cells, suggesting that these regions might be a lysosomal equivalent of this primitive eukaryotic cell.

V. B.  


## INTRODUCCION

1: Definicion de la enfermedad producida por *E. histolytica*  
*Entamoeba histolytica*, un protozooario eucariote unicelular, es el agente causal de amibiasis humana. Este parásito protozooario entérico es una de las células citotóxicas más potentes conocidas (Stilwell, 1955), y recibió su nombre por Schaudinn en 1903 por su capacidad de destruir tejidos en el humano. La infección ocurre cuando el parásito es ingerido en su forma quística en agua o alimentos contaminados. En el intestino delgado ocurre el equistamiento y los trofozoitos resultantes pueden colonizar el lumen intestinal, invadir el epitelio intestinal causando colitis y/o abscesos hepáticos, o enquistarse nuevamente para ser excretados (Petri 1994). Existen 2 especies de *E. histolytica* que difieren antigénica-( Petri, 1990) y genéticamente entre sí: una patógena y una no patógena con diferencias significativas en las secuencias de ADN (Tannich et al. 1989, 1991a, 1991). El nivel de divergencia en las secuencias de ADN entre estas dos especies es comparable con las divergencias entre genes humanas y de ratón (Clark & Diamond, 1994). Las amibas no-patógenas recibieron el nuevo nombre de *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925) y las amibas patógenas conservaron el nombre *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903). *E. histolytica* es una amiba patógena de virulencia variable con capacidad invasiva. Sin embargo, en la mayor parte de

los casos, la amibiasis es asintomática (Gathiram, 1985) y únicamente el 10% ( 40 - 50 x 10<sup>6</sup> casos anuales) de las personas infectadas cursan con el síndrome de amibiasis invasiva con una sintomatología muy variada que va desde colitis, disentería y/o abscesos (Walsh, 1988). El absceso hepático amibiano es la forma extraintestinal mas frecuente del padecimiento (Pérez-Tamayo, 1986). Existe controversia sobre los factores del huesped o del parásito que determinan la virulencia de la infección (Ravdin, 1990). *E. dispar* ha sido considerada una amiba no patógena, avirulenta, incapaz de invadir tejidos y por lo general no se detectan anticuerpos anti-amibianos séricos (Abd-Alla, M.D., 1993). Sin embargo, actualmente se considera una amiba patógena avirulenta debido a reportes de lesiones focales en la mucosa intestinal en algunas infecciones en animales (Clark, 1994).

Los marcadores de patogenicidad amibiana se resumen en la Tabla 1:

Tabla 1:

Marcadores de la Patogenicidad Amibiana

Producción de abscesos hepáticos en hamsters o gerbos

Aglutinación por concaavalina A

Adherencia a eritrocitos y células epiteliales

Fagocitosis de eritrocitos y células epiteliales

Zimodemos tipos II, IIa, VI, X, XI, XII, XIV, XIX

## **2. Datos epidemiológicos mundiales y mexicanos:**

La amibiasis una parasitosis de distribución mundial aunque ocurre menos frecuentemente en países desarrollados (Guarner, 1990). Según la Organización Mundial de la Salud aproximadamente  $500 \times 10^6$  personas sufren de amibiasis a nivel mundial (excluyendo a China) y  $40-50 \times 10^6$  casos anuales sufren amibiasis invasora de los cuales mueren 50 000-100 000 personas (Walsh, 1986). En México la amibiasis es endémica y no relacionada a condiciones climáticas. La edad de mayor frecuencia es la edad escolar. De la población mexicana estudiada, el 8.41% fueron seropositivos. Las áreas con mayor seroprevalencia  $\geq 9\%$  fueron el Norte y Noreste del país (Caballero-Salcedo, 1994).

## **3. Destrucción tisular: mecanismos moleculares**

La patogenicidad amibiana es el resultado de varios mecanismos moleculares y se lleva a cabo en 3 pasos:

- a) Adherencia de amibas a células del huésped.
- b) Muerte de células del huésped.
- c) Proteólisis de la matriz extracelular del huésped.

Las moléculas responsables se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2:

Moleculares de la Patogenicidad Amibiana

Adhesinas

Ameboporo

Fosfolipasas

Proteinasas de Cisteina

Colagenasa

a) La adherencia de *E. histolytica* a células del huésped es esencial para la colonización e invasión amibiana (Ravdin, 1989) y es mediada por lectinas de superficie amibianas, inhibibles por galactosa y N- acetil-galactosamina (Ravdin, 1985). La lectina es una glicoproteína de 170 kDa asociada a membrana (Petri 1987).

b) La poderosa actividad citotóxica amibiana células ha sido atribuido al ameboporo (Lynch, 1982; Young, 1982) el cual tiene un peso molecular de 14 kDa (Rosenberg, 1989). También se ha reportado un ameboporo de 5 kDa, el cual se purificó y se determinó su secuencia de amino ácidos. *E. histolytica* tiene un 80% más actividad formadora de poros que *Entamoeba dispar* (Leippe, 1993). Otras moléculas implicadas en la citotoxicidad amibiana son las fosfolipasas A, tanto calcio dependientes como calcio independientes, inhibibles por inhibidor de Rosenthal y fosfatidilcolina (Ravdin, 1985). La actividad de la fosfolipasa calcio dependiente ha sido localizada en la

membrana plasmática de la amiba (Long-Krug, 1985). La actividad citotóxica amibiana es dependiente de contacto. La células afectadas por la actividad citotóxica de *Entamoeba histolytica* sufren un patrón de fragmentación del ADN característico de una apoptosis (Ragland, 1994).

C) El efecto citopático amibiano ha sido atribuido a enzimas proteolíticas, responsables de degradar componentes de la matriz extracelular lo cual permite a *Entamoeba histolytica* migrar a través del tejido conectivo. Las enzimas proteolíticas y en especial las proteasas de cisteína y las metaloproteinasas han sido consideradas responsables de la capacidad invasiva de la amiba.

#### 4. Proteinasas en general:

Las enzimas proteolíticas o proteasas que hidrolizan proteínas o péptidos han sido clasificadas en dos grandes grupos: endopeptidasas o proteinasas y exopeptidasas o peptidasas. Las exopeptidasas cortan enlaces peptídicos de los extremos de los péptidos o proteínas y reciben su nombre por la especificidad de los grupos que atacan como aminopeptidasas o carboxypeptidasas, dependiendo del extremo de la molécula sustrato de donde se liberan los amino ácidos (Barrett, 1986). Las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos alejados de los extremos de la proteína y se clasifican por el mecanismo catalítico con el que rompen el enlace peptídico. Se piensa que por lo menos existen 4 grupos de proteinasas que son de serina,

cisteína, aspártico y metaloproteinasas. Se ha determinado que el mecanismo catalítico de cada uno de estos cuatro grupos de proteinasas incluye en forma muy importante a una agrupación de aminoácidos en el sitio activo y los tres primeros grupos derivan su nombre del aminoácido principal. El grupo de proteinasas de serina es el más grande y recibe su nombre del amino ácido serina, cuyo grupo hidroxilo está involucrado en la unión y catálisis del sustrato en el sitio activo. En las proteasas de cisteína o tiolproteinasas el grupo tiol del amino ácido cisteína desempeña un papel similar. Las metaloproteinasas tienen un requerimiento absoluto de metales como cofactores. Las metaloproteinasas tienen un ión metálico en el sitio activo, el cual desempeña un papel central en la unión con el sustrato. El metal más común es el zinc, pero existen algunas enzimas que utilizan otros metales. Las proteasas de aspártico utilizan dos cadenas laterales de ácido aspártico durante la catálisis.

##### **5. Proteinasas de *E. histolytica*:**

Hasta la fecha en *E. histolytica* sólo se han estudiado endopeptidasas y se piensa que el ataque hidrolítico inicial de la amiba sobre una proteína lo hacen las endoproteinasas y que las exopeptidasas amibianas sólo terminan la digestión de los péptidos que producen las primeras.



Los primeros estudios sobre proteasas amibianas fueron hechos en 1891 por Councilman y LaFleur. Ellos sugirieron que las amibas tienen una acción disolvente sobre el tejido infectado y es Schaudinn quien en 1903 les dio el nombre de *E. histolytica*, por su supuesto efecto lítico sobre los tejidos. Después de estos estudios pasaron alrededor de 70 años antes de que se volvieran a publicar estudios acerca de las enzimas proteolíticas como las responsables de algunos mecanismos patogénicos amibianos. Los estudios bioquímicos sobre las proteinasas amibianas que siguieron se hicieron más precisos debido al desarrollo de métodos de cultivo de amibas *in vitro* en medios axénicos desarrollado por Diamond en 1961. Las observaciones sobre los cambios degenerativos en las células epiteliales intestinales adyacentes a los trofozoitos invasivos (Ghadirian y Meerovitch, 1978) y sobre la disolución de la membrana basal de la mucosa intestinal estudiada por microscopía electrónica (Takeuchi, 1975) han sido atribuidos a una acción proteolítica. Las proteasas que se han descrito desde entonces y en parte han sido purificadas, caracterizadas y secuenciadas, se presentan en la Tabla 3:

Tabla 3

Proteasas de Entamoeba histolytica

<u>Nombre</u>	<u>Año</u>	<u>PM</u>	<u>Acción</u>
McLaughlin Faubert	1977	27	Purificación parcial proteínasa <u>cisteína</u> , pH 6, sustrato azocaseína
Lushbaugh	1978		Extractos amibianos: efecto citopático (desprendimiento de monocapa)
Bos	1979		Actividad citotóxica sobre monocapa BHK, lisis por contacto asociada a virulencia
Lushbaugh	1979	30	Purificación parcial de citotoxina (desprendimiento de monocapa)
Bos	1979	35- 45	Aísla y caracteriza toxina intracelular de extractos HK-9
Bos	1980	25	Aísla "toxinas", probablemente proteasas de cisteína, responsables de efectos citopático y citotóxico de extractos amibianos
McGowan	1982		Relación entre citotoxicidad y virulencia inhibible por inhibidores de proteasas
Muñoz, Calderón, Rojkind	1982 1984		Extracto amibiano: colagenasa específica para colágena tipo I
Gadasi Kessler	1983		Extracto amibiano: actúa sobre colágena
Gadasi Kobiler	1983		Correlación entre actividad proteolítica y virulencia: citotoxina responsable de desprendimiento celular

Lushbaugh	1984	24	Proteinasa <u>cisteína</u> neutra, actividad "citotóxica" con desprendimiento celular
Scholze Werries actividad	1984	21	Purificación parcial: proteasa ácida pH 4.4 de <u>cisteína</u> , sobre azocaseína
Avila Calderón	1985		Principales enzimas amibianas son de clase catalítica de <u>cisteína</u>
Lushbaugh	1985	16	Purificación: proteasa <u>cisteína</u> similar a "catepsina B", actividad sobre hemoglobina, caseína, correlación con virulencia
Keene	1986	56	Purifica proteasa <u>cisteína</u> neutra, efecto citopático sobre BHK, degrada colágena tipo I, fibronectina, laminina y elastina
Scholze Werries	1986		Purificación parcial de proteasa de <u>cisteína</u> parecida a catepsina B con actividad sobre colágena de piel de ternera
Pérez- Montfort	1987	56 40 27	Proteasas de <u>cisteína</u> encontradas en gel de sustrato
Schulte Scholze Werries	1987		Encuentra especificidad de proteinasa de <u>cisteína</u> contra péptido $\alpha$ 1-CB2 de colágena bovina tipo I
Luaces Barret	1988	27- 30	Purifican: "histolisina", proteasa de <u>cisteína</u> que degrada azocaseína, no degrada colágena nativa tipo I, secuencia amino terminal parecida a papaína
Scholze Schulte	1988	27- 30	Purifican: "amebapaina", proteinasa de <u>cisteína</u> , que digiere colágena bovina nativa tipo I sobre cadena $\alpha$ 2

Schulte Scholze	1989 27- 30	Amebapaina, proteasa de <u>cisteína</u> , secuencia de amino ácidos, digiere proteínas de la matriz extracelular humanas: colágena tipos IV y V, laminina y fibronectina en condiciones nativas.
Tannich Scholze	1991 30 1992	<u>Amebapaina, secuencia completa,</u> <u>digiere: laminina, fibronectina,</u> colágena bovina tipo I, cadena $\alpha$ -2 colágena humana, mRNA es 10-100X mas alto en cepas patógenas, tiene 81% homología con histolisina, <u>secuencia completa de histolisina:</u> <u>ambas proteasas de cisteína</u>
Reed McKerrow	1993 27	Clonan y secuencian tercer gen que codifica otra proteasa de <u>cisteína</u> , solo en cepas que producen enfermedad, 35-45% homología con amebapaina e histolisina, parecida catepsina L de fibroblastos malignos, no ha sido purificada
Montfort	1994 30	Purifican proteínasa de <u>cisteína</u> , secuencia amino terminal

La mayoría de las proteasas de cisteína estudiadas tienen pesos moleculares entre 24 y 30 kDa. Tanto la proteasa de 16 kDa como la de 56 kDa tienen propiedades similares a las proteinasas secuenciadas como la amebapaina o la histolisina y para ninguna de las dos primeras existen datos sobre su secuencia. En caso de la proteasa de 56 kDa es posible que se trate de un precursor de alguna de las proteasas de 24 a 27 kDa, o que se trate de un dímero

estable. Un resultado más concluyente sobre su identidad se puede obtener por medio de secuenciación de ambas proteasas. El trabajo de Montfort (1994) sugiere la posibilidad de la formación de agregados de la proteasa lo cual explicaría los altos pesos moleculares altos señalados por algunos autores.

Sin embargo, las proteasas de cisteína no son las únicas proteasas amibianas, a las que se les ha atribuido un papel importante en la patogenia amibiana. Muñoz, Calderón y Rojkind (1982) describieron una actividad de colagenasa en trofozoitos enteros de *E. histolytica* parecida a la de una colagenasa de mamífero. Más recientemente, Muñoz (1990) ha mostrado, por microscopía electrónica, la formación de gránulos electrodensos que aparecen durante la incubación de trofozoitos con colágena *in vitro*. Estos gránulos aparecen en la membrana plasmática del trofozoito de donde son liberados al medio. Ellos logran inhibir la actividad colagenolítica por medio de EDTA, un inhibidor de metaloproteinasas, pero también afectan profundamente la viabilidad del organismo *in vitro*. Hasta la fecha los datos bioquímicos y estructurales de una metaloproteasa amibiana siguen siendo preliminares.

En conclusión:

Las proteinasas de cisteína son la clase catalítica más abundante de las enzimas proteolíticas de *Entamoeba histolytica* (Pérez-Montfort et al., 1987). Aunque estas moléculas seguramente desempeñan un papel en funciones

celulares (McLaughlin y Aley, 1985), también han sido implicadas en la invasión y destrucción tisular (Becker et al., 1989; McKerrow et al., 1993).

Varios grupos han purificado de manera parcial o completa a proteinasas de cisteína de lisados celulares de *E.*

*histolytica* (McLaughlin y Faubert, 1977; Scholze y Werries, 1984; Lushbaugh et al.; Keene et al., 1986; Luaces y

Barrett, 1988; Scholze y Schulte, 1988; Montfort et al.,

1994). Muchas de estas enzimas han sido caracterizadas

bioquímicamente, pero únicamente dos han sido clonadas y

secuenciadas (Tannich et al., 1992). Estas dos proteinasas

llamadas "amebapaina" (Scholze, 1991) e "histolisina"

(Luaces y Barrett, 1988) tienen una homología del 81% a

nivel de amino ácidos y comparten una masa molecular

relativa de aproximadamente 30 kDa. Aunque estas proteasas

se han encontrado tanto en amibas patógenas como en no

patógenas, los niveles de expresión de mRNA para amebapaina

son 10 a 100 veces mayores en amibas patógenas.

Recientemente se ha determinado la secuencia de nucleótidos

de una proteinasa que tiene homología con catepsina L y es

exclusiva de cepas patógenas (Reed et al., 1993). La

secuencia de esta proteinasa tiene entre 35 y 45% de

homología con la amebapaina y la histolisina y muestra más

homología con la catepsina L que con la catepsina B o la

papaína. Como la catepsina L es la proteína principal

secretada por los fibroblastos que han sufrido

transformación maligna, los autores especulan que la

proteínasa recién descrita puede ser la responsable de la invasividad amibiana, en forma análoga a lo que se ha descrito para ciertos tipos de células cancerosas. Sin embargo, todavía es necesario purificar esta proteínasa y hacer estudios sobre su actividad proteolítica, su especificidad y otras características como las que se han descrito para la amebapaína y la histolisina.

Las proteínasas de cisteína se caracterizan por su amplio espectro de pH óptimo que varía desde 5.5 hasta 7.5. Esto les permite funcionar en una gran variedad de condiciones y microambientes siempre y cuando haya ausencia de inhibidores y suficiente agente reductor para evitar que el grupo tiol del sitio activo sea oxidado.

La localización subcelular puede ayudar a entender el papel que desempeñan estas proteasas en los mecanismos invasivos y destructivos de la amiba. Estudios anteriores realizados para determinar la localización de las proteasas en distintos compartimientos celulares han sugerido que pueden estar asociados a la membrana plasmática (Ostoa-Saloma et al., 1989; Avila y Calderón, 1993, a vesículas citoplasmáticas (Scholze et al., 1992; Ostoa-Saloma et al., 1989) y a compartimientos citoplasmáticos solubles de la amiba (Ostoa-Saloma et al., 1989).

#### **6. Lisosomas y localización de las proteínasas:**

*Entamoeba histolytica* carece de varios de los organelos descritos en células eucarióticas como: mitocondrias,

microtúbulos, aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso. Hay descripciones controvertidos de posibles "lisosomas" amibianos. Hasta la fecha no se han encontrado lisosomas, o sea organelos citoplásmicos con enzimas lisosomales solubles en su interior delimitados por una membrana. Ensayos bioquímicos y citoquímicos de fracciones membranales de la amiba han revelado que una enzima lisosomal característica, la fosfatasa ácida, no se encuentra en forma soluble, sino que constituye una parte de la membrana. Serrano (1977), Eaton (1970), Rosenbaum y Wittner (1970) y Aley (1980) observaron que la actividad de fosfatasa ácida estaba asociada a membranas de vacuolas y no libre dentro de la vacuola. Estos hallazgos fueron confirmados por Treviño-García Manzo (1971) y Lushbaugh (1976). Rondanelli (1977) encuentra que la membrana plasmática amibiana también tiene actividad de fosfatasa ácida. Sin embargo, hasta la fecha, no se han descrito lisosomas primarios (vesículas que contienen hidrolasas) en la amiba. No se han encontrado pruebas de fusión de una vacuola fagocítica con vesículas lisosomales o formación de un sistema reticular de canales semejantes a un retículo endoplásmico liso. Eaton, Meerovitch y Costerton (1969) describen "lisosomas" en la superficie de la amiba mediante una técnica de tinción para fosfatasa ácida de Gomori con observaciones ultraestructurales. En su publicación presentan una micrografía electrónica con estructuras que interpretan como lisosomas, una muy superficial que está



asociada a "lisosomas internos" y a un posible aparato de Golgi. El "lisosoma superficial" posee un "órgano vermiforme tipo gatillo" que protruye de la superficie amibiana y especulan acerca de su activación mecánica por contacto. Esta especulación resultó falsa ya que el órgano "gatillo" resultó ser un filopodium (Deas y Miller 1977). Un estudio reciente sobre la localización subcelular de la proteasa amibiana fue realizado por Scholze (1992) utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra la amebapaina. En este estudio se observó que las partículas de inmuno-oro únicamente se localizaron en vesículas fagocíticas que contenían partículas de óxido de fierro fagocitadas y algo de marcaje en membranas. Encuentran que el marcaje siempre se asociaba a una matriz a nivel de membrana o estaba dentro de vesículas fagocíticas. Los autores proponen que las vesículas pinocíticas pudieran hacer la función de los lisosomas de células eucarióticas y que la matriz asociada a la membrana plasmática retiene la proteasa a nivel de membrana cuando el contenido vesicular es expulsado. Sin embargo, no se analizó un marcaje en ausencia de fagocitosis para determinar la localización de la enzima en la amiba en estado basal. Otro problema de este estudio radica en que los anticuerpos policlonales utilizados reconocen a múltiples epítopes, algunos de los cuales pueden ser compartidos entre varias proteinasas diferentes. En teoría, el uso de anticuerpos monoclonales permite obtener resultados menos ambiguos.

7. Objetivos de la tesis:

- a) La preparación de un anticuerpo monoclonal dirigido contra una proteinasa de cisteína de 30 kDa de *Entamoeba histolytica* HM-1.
- b) Analizar la naturaleza de la proteasa.
- c) Describe su localización subcelular tanto en condiciones basales como posteriores a la eritrofagocitosis.
- d) Analizar el efecto del mAb sobre la actividad citopatogénica de la amiba.

## Material y Metodos

### 1.- Antígeno:

El antígeno utilizado fue una proteinasa de cisteína de 30 kDa (fracción 16) purificado de trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS por Montfort et al. (1994). La enzima fue purificada por cromatografía de afinidad Ultrogel ACA 54 utilizando un extracto de trofozoitos axénicos de *Entamoeba histolytica* HM-I-IMSS. El pico IV de esta purificación mostró actividad de proteinasa de cisteína y se utilizó para un segundo paso de purificación mediante cromatografía líquida de alta presión en una columna de superosa. La fracción 16 (Fr.16) obtenida de esta purificación mostró una sola banda de proteína en electroforesis y actividad de proteinasa de cisteína y se utilizó como antígeno para la producción del anticuerpo monoclonal.

### 2.- Producción del anticuerpo monoclonal:

Se inmunizaron ratones singénicos BALB/c con 50 ug de la Fr.16 con adjuvante completo de Freund por vía intraperitoneal. Una semana después se reinmunizaron los ratones con 50 ug de Fr.16 con adjuvante incompleto de Freund i.p. y a la tercer semana se inmunizaron con 50 ug de Fr.16 sin adjuvante por vía intravenosa. Cuatro días después de la última inmunización se realizó la fusión.

#### a) Fusión y cultivo celular:

Para la fusión se utilizó el mieloma X63-Ag8.653 (donado por el Dr. J. Calderón, CINVESTAV, IPN). Las células del mieloma se fusionaron con células hiperinmunes de bazo de ratones BALB/c en relación de 5 células de bazo por célula de mieloma ( $40 \times 10^6$ ). La fusión se realizó con polietilenglicol (PEG) 1500 al 50% w/v en RPMI a  $37^\circ \text{C}$  (Zimmermann et al., 1994). Una vez fusionadas, las células se cultivaron en RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino en una incubadora a  $37^\circ \text{C}$  con 5%  $\text{CO}_2$ . Después de 24 hrs se cambiaron a un medio selectivo RPMI con 10% suero fetal bovino suplementado y HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Este medio selectivo permite la supervivencia únicamente de las células fusionadas. La aminopterina bloquea la vía biosintética principal de ácidos nucleicos. Los mielomas que se utilizan para las fusiones carecen de la enzima HGPRT (hipoxantina guanina fosforibosil transferasa) requerida para poder utilizar una vía alterna para la biosíntesis de ácidos nucleicos por lo cual estas células mutadas mueren en presencia de aminopterina. Las células normales, que contienen la enzima HGPRT, pueden continuar sintetizando ácidos nucleicos en presencia de aminopterina mediante una vía alterna siempre que haya suministro adecuado de hipoxantina y timidina. En una fusión los hibridomas resultantes heredan el gene para HGPRT de las células normales y sobreviven en el medio HAT. Los linfocitos de bazo no fusionados mueren en cultivos prolongados sin suplementos de crecimiento celular, de

manera que únicamente las células fusionadas pueden sobrevivir un cultivo prolongado en presencia de HAT ya que el mieloma transfiere su característica neoplásica inmortal y el linfocito transfiere la enzima HGPRT necesaria para la sobrevivencia celular en presencia de aminopterina.

Después de 14 días se empezó a observar la proliferación de los hibridomas y se hizo la selección de aquellos que fueron productores del anticuerpo monoclonal. La selección se hizo mediante ensayos con inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA).

b) Selección mediante ELISA:

Las pruebas de ELISA se realizaron en placas E.I.A./ R.I.A. (Costar) pretratadas para una mayor capacidad de adsorción de proteínas. Las placas de ELISA se recubrieron con 0.65 ug FR.16 en 50 ul solución amortiguadora de acoplamiento (100mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) por pozo. Se incubó el antígeno durante 12 hrs a 4°C. Posteriormente se lavó la placa en PBS (amortiguador salina fosfatos) pH 7.4. Se bloqueó la placa con 1.6% leche descremada disuelta en PBS y Tween 20, 0.05% durante 1 hr a temperatura ambiente. Después de una lavada en PBS se aplicaron 50 ul del sobrenadante de cultivo por pozo. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, se lavó extensamente en PBS y se agregó el anticuerpo secundario conejo anti-IgG de ratón (cadenas pesadas y ligeras) peroxidado (Zymed, San Francisco, CA) diluido 1/1000 en solución bloqueadora a temperatura ambiente durante 2 hrs. Nuevamente se lavó la

placa extensamente y se reveló la peroxidasa acoplada al anticuerpo por medio del sustrato: 100 ul ABTS 2,2-Azino-bis ( Acido 3-Ethylbenz-Thiazoline-6-Sulfonico) (100 mM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 5 ml ácido cítrico 100 mM pH 4.2 y 5 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 20 min a 37°C. Finalmente se determinó la densidad óptica de los pozos en un lector de ELISA a 405 nm con filtro de referencia 490 nm.

c) Clonación y expansión de hibridomas:

Una vez identificados los pozos con hibridomas productores de anticuerpos, se realizaron 3 clonaciones sucesivas para establecer clonas de hibridomas provenientes de una célula única productora de anticuerpos monoclonales. Las clonaciones se realizaron mediante diluciones limitantes en medio RPMI enriquecido con 20% suero fetal bovino definido (Hyclone), Hepes 20-50 mM y HT (hipoxantina, timidina). Después de cada clonación por dilución limitante se verificó microscópicamente que no hubiera más de una célula por pozo que pudiera dar origen a varias clonas con producción de más de un anticuerpo o bien que pudiera proliferar en exceso y eliminar el cultivo del hibridoma de interés. Una vez clonados los hibridomas se analizaron nuevamente mediante pruebas de ELISA para asegurar la producción de anticuerpos monoclonales, ya que frecuentemente hay mutaciones al eliminarse el ADN sobrante de la fusión. Las células diploides de ratón tienen 40 cromosomas y el hibridoma resultante de una fusión

inicialmente contiene 80 cromosomas. Este genoma es muy inestable y se pierden cromosomas durante los primeros días de cultivo, lo cual puede llevar a un cese en el crecimiento o bien alteraciones en la síntesis o secreción de inmunoglobulinas (Köhler y Milstein, 1975).

Una vez verificado la capacidad del hibridoma para producir mAb se congeló en tanques de nitrógeno líquido en medio de congelación: 10% DMSO (dimetil sulfoxido, Sigma), 20% Suero Fetal Bovino Hyclone y 70% RPMI. Se expandieron los cultivos para obtener los anticuerpos en los sobrenadantes. Para tener una concentración mayor (100X más que sobrenadantes) se prepararon ratones singénicos BALB/c para la producción de ascitis. Inicialmente se inyectaron 0.5 ml pristane (2,6,10,14-tetra-metil-pentadecano, Sigma) en la cavidad peritoneal del ratón. Esto induce una inflamación que permite una mejor anidación de los hibridomas. 10 días después se inyectaron  $1 \times 10^6$  células del hibridoma i.p. por ratón. Alrededor de 2 semanas después se inició la producción de ascitis y generalmente el volumen de líquido ascítico en la cavidad peritoneal aumentaba al máximo a los 3 días. En este momento se puncionó la cavidad abdominal del ratón. El líquido de ascitis se centrifugó a 240 x g durante 10 min para separar las células del sobrenadante rico en inmunoglobulinas. Se congeló el sobrenadante con los anticuerpos monoclonales y las células se utilizaron para propagar la producción del líquido de ascitis.

d) Purificación e isotipo del mAb:

Se precipitaron los sobrenadantes de cultivo y los líquidos de ascitis con 50% de sulfato de amonio saturado agitando a 4°C durante 1 hora y sin agitación durante otras 12 hrs. Se centrifugaron a 28 000 x g durante 30 min. El botón se resuspendió en la tercera parte del volumen inicial en Tris (Trizma Base Tris (hidroximetil) aminometano, Sigma) 10 mM pH 7.4. y se dializó contra 1000 x el volumen de Tris en 2 cambios. Posteriormente se pasó por una columna de Sefarosa-Proteína A.

Determinación de isotipo de inmunoglobulinas:

Se determinó el isotipo mediante un equipo comercial:

(INNO-LIA Mouse MAB Isotyping; Biosource International, Westlake Village, CA) y se encontró que el mAb era IgG1 la cual tiene muy baja afinidad por proteína A (Langone, 1982). Por esta razón se trabajó con el anticuerpo semipurificado por precipitaciones en sulfato de amonio saturado.

**3.- Naturaleza del epítipo reconocido por el mAb:**

a) Inmunoelectrotransferencia (Western Blot) (Mr, carbohidratos, proteína):

Se realizaron inmunotransferencias utilizando tanto lisados amibianos completos como la fracción semipurificada IV y la fracción 16 pura.

Las electroforesis de proteínas se realizaron en geles de poliacrilamida al 12%. Las proteínas separadas se



transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) con 100 V durante 2 h a 4°C en Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20% metanol (v/v) pH 8.3. Los marcadores de peso molecular y parte de las proteínas fueron teñidas con azul de coomasie al 0.1% en metanol del 50% y desteñidas en metanol 20% y ácido acético 10%. El resto de la membrana se bloqueó durante 12 hrs con 20% leche descremada en agua bidestilada. Posteriormente se lavó 4 veces en amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.4 con NaCl 150 mM y Tween 20, 0.01%. La membrana fue cortada en tiras. Algunas de la tiras fueron incubadas con tripsina (1 ug/ml) en amortiguador Tris-HCl 0.01 M pH 7.4 durante 60 min a 37°C. Posteriormente fueron lavadas en amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.4 con NaCl 150 mM, Tween 20, 0.01% e incubadas en 5 ug de inhibidor de tripsina de frijol de soya en el mismo amortiguador durante 10 min a 37°C y lavadas 4 veces con el mismo amortiguador. Otras tiras fueron incubadas en glicosidasas (1 mg/ml) "mixtas", obtenidas de *Turbo cornutus* o de *Charonia lampas* en Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), o en amortiguador de acetatos 10 mM (pH 4) durante 1 h a 37°C. Posteriormente fueron lavados 5x en Tris-HCl-NaCl-Tween 20 y con Tris 10 mM pH 7.4. Otras tiras fueron incubadas con periodato de sodio 50 mM (Woodward et al., 1985) en amortiguador de acetatos de sodio 50 mM pH 4.0 a temperatura ambiente en obscuridad durante 1 hora para eliminar los carbohidratos.

Posteriormente se lavaron en amortiguador de acetatos y se incubaron con borohidruro de sodio 50 mM en Tris 100 mM pH 7.4 por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron 5 veces en TBS-Tween 20. Las tiras con los distintos tratamientos fueron incubadas tanto con líquido de ascitis 4D-6 completo precipitado con sulfato de amonio y con sobrenadantes de cultivo precipitados con sulfato de amonio durante 12 h a 4°C. Los controles fueron los líquidos de ascitis con anticuerpos no relacionados o bien IgG normal de ratón. Después se lavaron 3x en el mismo amortiguador y se incubaron con el anticuerpo secundario de conejo anti IgG ( H+L) de ratón conjugado con peroxidasa (Zymed, San Francisco, CA) a una dilución 1/1000 durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas 3x en Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4 (TBS) y 2x en Tris-HCl 100 mM pH 7.4, sin NaCl ya que el Na inhibe a la peroxidasa.

Finalmente se reveló la peroxidasa con 0.5 mg/ml 3-3'diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) en Tris-HCl 100 mM pH 7.4 que contenía 100 ul de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 min (10 ml Tris 100 mM + 5 mg diaminobenzidina+ 100 ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%). La reacción se detuvo con agua de la llave.

b) Inmunoprecipitado (Mr, actividad proteolítica por zimograma, en azocaseína):

Para los inmunoprecipitados se acopló el anticuerpo monoclonal del líquido de ascitis precipitado con sulfato

de amonio a Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) según las técnicas recomendadas por el proveedor. Se resuspendió el polvo de Sefarosa en 1 mM HCl y se lavó en 1mM HCl. El anticuerpo se dializó contra amortiguador de carbonatos: NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, pH 8.3, NaCl 500 mM y se mezcló con el gel hidratado durante 2 h a temperatura ambiente o 12 hrs a 4°C. Se lavó con amortiguador de carbonatos para eliminar el ligando en exceso y se bloquearon los grupos activos con Tris-HCl 100 mM, pH 8 durante 2 hrs a temperatura ambiente. Se lavó el producto con 3 ciclos alternantes de amortiguadores de acetato 100 mM, pH 4, NaCl 500 mM y Tris 100 mM, pH 8, NaCl 500 mM. También se preparó una resina control acoplada a un líquido de ascitis precipitado con sulfato de amonio pero no relacionado con anticuerpos anti-amiba.

La precipitación se realizó con la Fr. IV, obtenida de lisados amibianos, enriquecida en proteinasas de cisteína. Se obtuvo la fracción IV en presencia continua del inhibidor irreversible de proteinasas de cisteína (trans-Epoxy succinyl-1-leucylamido-(4-guanidino)butano (E-64) 0.1 mM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La fracción IV así obtenida tuvo un 82.6% de inhibición de su actividad proteolítica sobre azocaseína. Se incubaron 0.5 ml tanto de sefarosa mAb 4D-6 como sefarosa IgG normal de ratón con 1 ml fracción IV (32 mg/ml) durante 1 hora a 4°C en agitación en un balancín. Ambos precipitados se lavaron 6 veces con

PBS y los inmunoprecipitados se resuspendieron en 30 ul de amortiguador de corrida (4 ml SDS al 10%, 3.2 ml Tris 500 mM pH 6.8, 1 mg bromofenol aforado a 10 ml con glicerol), se hirvió y se realizó la electroforesis en gel al 12% (SDS-PAGE).

#### Zimograma del inmunoprecipitado:

Para analizar si el antígeno reconocido por el mAb 4D-6 tenía actividad proteolítica se realizó un zimograma del inmunoprecipitado con el lisado amibiano completo, inhibido con PHMB 10 mM. El lisado amibiano se obtuvo de  $40 \times 10^6$  trofozoitos HM-1 lisados en tritón X-100 al 0.01% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a  $63\ 000 \times g$  durante 30 minutos y se utilizó el sobrenadante para los experimentos de la inmunoprecipitación. Se coincubó 1 ml de sefarosa-mAb 4D-6 con 0.5 ml lisado amibiano y como control se utilizó 1 ml de sefarosa acoplada a un anticuerpo monoclonal (M-5) no relacionado. Los precipitados se colocaron 1 hora en un balancín a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se hizo un lavado por 6 veces en PBS, se centrifugó a  $4320 \times g$  y a la cama de sefarosa seca se le aplicaron 600 ul del cóctel de la muestra (ME 100 mM, SDS 4%) sin hervir durante 5 minutos en el balancín. Se centrifugó y 300 ul del sobrenadante se utilizaron para una electroforesis en gel de sustrato, los cuales se aplicaron a un SDS-Gel sin peine. A los restantes 300 ul se les determinó la actividad proteolítica sobre azocaseína. Este gel se colocó sobre un gel de gelatina (4

ml gelatina, 4 ml Tris 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.4, 4 ml acrilamida 30% y bisacrilamida 0.8%, 80 ul persulfato de amonio, 30 ul Temed) durante 48 horas a 37°C. Posteriormente se tiñó el gel de gelatina en azul de coomasie 0.1%, metanol 20%, ácido acético 10%.

Determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína: Se coincubaron 200 ul de la muestra con 400 ul azocaseína (10 mg/ml) durante 3 horas a 37°C. Posteriormente se precipitaron con ácido tricloracético (TCA) al 20%, se centrifugó a 4000 x g durante 5 min. Del sobrenadante se determinó la densidad óptica en espectrofotometría a 366 nm. Se determinó el grado de inhibición tomando una muestra control de 400 ul de azocaseína incubada con 200 ul de PBS y se consideró como el 100% de actividad.

c) Inhibición de proteólisis por el mAb::

Para analizar si el anticuerpo estaba dirigido contra el sitio activo de la proteinasa se utilizó la fracción 16, una fracción purificada obtenida por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) la cual fué concentrada. Se incubaron 200 ul de Fr. 16 (50 ug proteína/muestra) con cantidades decrecientes de sefarosa 4D-6, manteniendo la enzima constante y el anticuerpo decreciente con diluciones progresivas 1:2. La muestra mas concentrada contenía 1 ml de sefarosa y 200 ul de la Fr.16. Un control consistió de 200 ul de Fr. 16 en 1ml de PBS. El control negativo se realizó con sefarosa acoplada a IgG normal de ratón.

Tubo 1: 200 ul Fr. 16 + 1000 ul PBS

- 2: 200 ul Fr. 16 + 1000 ul sefarosa 4D-6
- 3: 200 ul Fr. 16 + 500 ul sefarosa 4D-6 + 500 ul PBS
- 4: 200 ul Fr. 16 + 250 ul sefarosa 4D-6 + 750 ul PBS
- 5: 200 ul Fr. 16 + 125 ul sefarosa AD-6 + 875 ul PBS
- 6: 200 ul Fr. 16 + 62.5ul sefarosa 4D-6 + 937.5 ul PBS

Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Se incubaron en un balancín a 4°C durante 3 horas. Se centrifugaron a 4320 x g durante 2 min, se tomaron 200 ul del sobrenadante los cuales se coincubaron con 400 ul azocaseína durante 3 horas a 37°C para la determinación de la actividad proteolítica del sobrenadante. La azocaseína no digerida se precipitó con TCA al 20%, se centrifugaron a 4320 x g durante 5 min en frío y se determinó la densidad óptica a 366 nm. Se determinó la inhibición específica restando los valores obtenidos con la IgG control de ratón de los valores correspondientes al mAb 4D-6.

d) Colagenolisis por el inmunoprecipitado:

Como la secuencia de aminoácidos la proteinasa de cisteína purificada en la Fr. 16 contra la cual se hizo el anticuerpo monoclonal podría ser tanto de la histolisina como de la amebapaina (Montfort et al., 1994), se decidió determinar contra cual de las dos se encontraba dirigido el mAb por medio de una prueba funcional. El experimento consistió en purificar la proteinasa por medio de inmunoprecipitación y analizar su capacidad para degradar colágena nativa tipo I. El resultado negativo del experimento sugeriría que el antígeno correspondía a la

histolisina, que es incapaz de degradar a colágena nativa tipo I (Luaces y Barrett, 1988), mientras que el resultado positivo apoyaría que el antígeno correspondía a amebapaina (Schulte y Scholze, 1989), sin embargo quedaba la posibilidad de que el mAb reconociera un epítoto compartido entre histolisina y amebapaina.

La proteinasa de un lisado fresco de amibas captada por el mAb 4D-6 se incubó con colágena nativa tipo I de tendón de rata acetilada con anhídrido acético según la técnica de Lefevre et al. (1979) la cual fue donada por la Dra. I. Montfort.

Se incubaron 350 ul de un lisado amibiano ( $40 \times 10^6$ ) fresco obtenido el mismo día, sin inhibidores de proteasas con 300 ul de sefarosa-mAb 4D-6 en tubos Eppendorf en balancín a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Posteriormente se lavaron con TBS frío y a  $4^{\circ}\text{C}$ . La última lavada se realizó con Tris-HCl 30 mM, pH 7, NaCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  100 mM. A un grupo de tubos se les agregó el inhibidor irreversible de proteinasas de cisteína E-64, 0.1 mM, a otro grupo de tubos se agregó 1-10 fenantrolina, 10 mM (quelante de metales catiónicos divalentes como calcio, y activa algunas proteinasas de cisteína, e inhibe metaloproteinasas). Otro grupo de muestras no fueron pretratadas; se incubaron durante 15 a 20 min. Posteriormente se agregaron 100 ul con  $3 \times 10^9$  cpm de colágena tritiada (actividad específica de  $4 \times 10^9$  cpm/mg) a cada tubo y se incubó bajo agitación a  $32^{\circ}\text{C}$ . Como controles se analizaron la degradación espontánea de la colágena y

una digestión de colágena por colagenasa bacteriana en el cual se incubaron 100 ug de colagenasa tipo IV de *Clostridium histolyticum* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (1mg/ml disuelto en 1 ml Tris 30 mM, pH 7.4, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 100 mM) con 100 ul colágena. Después de 1.5, 2.5 y 20 horas de incubación a 32°C se tomaron 10 ul de todas las muestras para SDS-PAGE. Inicialmente se hirvieron las muestras antes de agregar SDS y mercaptoetanol (para inactivar proteasas). Posteriormente se hirvieron las muestras nuevamente con el amortiguador de corrida con SDS y mercaptoetanol y se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se tiñó el SDS-PAGE con azul de Coomasie para la toma de una fotografía inicial y posteriormente se utilizó el gel para una fluorografía. Para esto se colocó el gel en una solución EN<sup>3</sup>HANCE (Dupont, Wilmington, DE) durante 1 hora, se lavó 3x en agua destilada y se secó.

Para la fluorografía se colocó el gel seco entre placas Hyperfilm-MP (Amersham, Buckinghamshire, England) durante 1 mes a -70°C. Se analizó en gel expuesto a una placa de autoradiografía

#### 4.- Inmunolocalización de la proteinasa:

##### a) Inmunofluorescencia *in vitro*:

Se lavaron  $1 \times 10^6$  trofozoitos 2x en PBS y posteriormente se fijaron en acetona fría durante 20 min, se lavaron 2x en TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) y se incubaron con 1



ml de líquido de ascitis precipitado 4D-6 durante 3 horas a temperatura ambiente sobre un balancín. Se lavaron 3x con TBS y se centrifugaron a 240 x g durante 2 minutos. Se incubaron con el segundo anticuerpo cabra anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Zymed, San Francisco, CA) 1/100 durante 2 horas en balancín a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 2x en TBS y se observaron en un microscopio con epifluorescencia.

b) *Inmunoperoxidasa in vivo:*

Se produjeron abscesos hepáticos en el hámster con una inyección intraportal de  $1 \times 10^6$  trofozoitos HM-1 en 0.2 ml de PBS según la técnica descrita por Tsutsumi et al., (1984). Se sacrificaron los animales a diferentes intervalos de tiempo desde 1 hora hasta 2 días. Se extrajo el hígado, se cortó en pequeños fragmentos los cuales se fijaron en formaldehído al 10% en H<sub>2</sub>O, se incluyeron en parafina, se cortaron con un micrótomo a un espesor de 4  $\mu$ m, se depositaron sobre un cubreobjetos y se desparafinaron. Para eliminar el peróxido endógeno se incubaron las laminillas en 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 5 minutos, se lavaron 2x en TBS y se incubaron con el líquido de ascitis precipitado 4D-6 durante 12 hrs en cámara húmeda a temperatura ambiente. Como control se utilizó IgG normal de ratón. Posteriormente se lavaron 6x en TBS y se aplicó el anticuerpo secundario cabra anti-ratón biotinilado (Zymed, San Francisco, CA) en dilución 1/100. Este anticuerpo secundario previamente había sido absorbido con

homogenado de hígado de hamster durante 1 hora a temperatura ambiente en balancín, se centrifugó a 4320 x g durante 2 min y el sobrenadante se aplicó sobre las muestras durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de 3 lavadas en TBS y 2 lavadas en Tris-HCl 100 mM, pH 7.4 (sin NaCl) se aplicó el complejo streptavidina-biotina-peroxidasa (Strept AB Complex DAKO, Copenhagen, Denmark) preparado 30 minutos antes de la aplicación según especificaciones del fabricante. Se agregaron 4 a 6 gotas del complejo AB a las muestras y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron 3x con Tris 100 mM y se reveló la peroxidasa con diaminobenzidina (DAB) 2.5 mg en 5 ml Tris 100 mM y 50 ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante algunos minutos bajo observación microscópica. Se paró la reacción con agua de la llave y se contratiñeron las laminillas con hematoxilina durante 1 minuto.

c) Inmuno-oro ultraestructural:

Se realizó inmunocitología ultraestructural en amibas adheridas a un cubreobjetos y cortadas en monocapa. Para la adherencia se cultivaron trofozoitos HM-1 en medio TYI-S-33 en tubos de vidrio durante 3 horas a 37°C en presencia de un cubreobjetos de plástico introducido al tubo de cultivo. Para lograr un óptimo marcaje del inmuno-oro inicialmente se utilizó la siguiente técnica: el cubreobjetos fue retirado del tubo de cultivo y se fijaron las amibas en glutaraldehído al 1% en buffer de fosfatos de Sörensen

0.19M, pH 7.2. No se posfijaron y se deshidrataron en etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se incluyeron en resina hidrosoluble LR-White-etanol 1:2 a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 hrs (Causton, 1985). Los cortes se montaron en rejillas de nickel cubiertas de Formvar y procesadas para inmuno-oro. El anticuerpo primario (ascitis precipitado 4D-6) se aplicó 1/100 durante 18 hrs a  $4^{\circ}\text{C}$ . Como control de isotipo se utilizó IgG normal de ratón. Se lavaron 3X en buffer de lavado y se aplicó el anticuerpo secundario (cabra anti-ratón ICN) acoplado a esferas de oro de 20 nm, diluido 1/10 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó una contrastación rápida con acetato de uranilo acuoso. Mediante ésta metodología se obtuvo excelente inmuno-marcaje pero con una pobre apreciación de las estructuras amibianas.

Como control de la ultraestructura se procesaron algunas monocapas amibianas cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio con fijación en glutaraldehido, postfijación en tetróxido de osmio, inclusión en araldita y contrastación completa lo cual permite ver núcleos y membranas.

Para mejorar la inmunocitología ultraestructural, conservando de manera óptima la ultraestructura, se introdujo una modificación de la técnica descrita por Bendayan y Zollinger (1983) y Sasaki y Ueno-Matsuda (1993) en la cual se eliminó el paso de un pretratamiento de la muestra con una solución saturada de metaperiodato de sodio. Se fijó la monocapa amibiana adherida a un cubreobjeto de vidrio con glutaraldehido al 1% en buffer de

fosfatos de Sørensen 190 mM, pH 7.2 durante 1 hora a 4°C y se posfijó en tetróxido de osmio al 1% únicamente durante 5 minutos. Posteriormente se deshidrataron las muestras en alcoholes de graduación creciente hasta óxido de propileno y se incluyeron en resina Epon 812 (Epoxy Resin) de la siguiente manera: se colocaron los cubreobjetos sobre cápsulas de BEEM llenas de Epon 812 de manera que la monocapa amibiana quedaba sumergida en la resina durante toda la noche a temperatura ambiente, para permitir una infiltración adecuada de la resina en la monocapa. Posteriormente se calentaban las cápsulas de BEEM a 55°C durante 48 horas para permitir una adecuada polimerización. Al final se congelaron las cápsulas de BEEM y se desprendió el cubreobjetos quedando la monocapa amibiana incluida en el Epon. Se realizaron cortes ultrafinos los cuales se montaron en gradillas de níquel cubiertas en Formvar y procesadas para el inmuno-oro. Inicialmente se bloquearon para lo cual se colocaron las rejillas sobre una gota de albúmina sérica bovina (ASB) al 1% en PBS con 0.05% Tween 20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron, sin previo lavado, sobre una gota de ascitis precipitado no diluido durante 18 horas a 4°C en una cámara húmeda. Como control se procesaron muestras con IgG normal de ratón. Se lavaron las rejillas con PBS estéril y se incubaron con anticuerpo secundario cabra anti-ratón acoplado a partículas de oro de 20 nm (ICN, Costa Mesa, CA) diluido 1:10 en PBS con 0.1% ASB y 0.05% Tween 20 en una

cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavaron en PBS y en agua desionizada y finalmente se realizó una contrastación rápida con acetato de uranilo acuoso al 2%. Para la inmunocitología ultraestructural con eritrofagocitosis amibiana se adhirieron trofozoitos HM-1 a un cubreobjetos durante 3 horas a 37°C en medio TYI-S-33. Se agregó sangre humana al cultivo durante 30 min en una relación de 20 eritrocitos por amiba, se retiraron los cubreobjetos y se procesaron según la técnica descrita anteriormente. Mediante la introducción de esta técnica se pudo conservar un excelente marcaje del inmuno-oro y simultáneamente obtener una buena citología ultraestructural.

Se analizaron los cortes en un microscopio electrónico ZEISS EM-109

#### **5.- Efecto del mAb sobre la actividad citopática de *E.***

##### ***histolytica*:**

Se cultivó la línea celular MDCK (Madin-Darby canine kidney epithelial cell line) donada por la Dra. Cecilia Ximenez (Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM), en cámaras de cultivo (culture chambers, NUNC, Roskilde, Dinamarca) montadas sobre portaobjetos. Una vez formada la monocapa de células crecida a confluencia se agregaron  $3 \times 10^5$  trofozoitos amibianos a las células MDCK en presencia de ascitis precipitado 4D-6, de E-64 0.1mM o de ascitis no relacionado. Un grupo control de células MDCK no

recibió ningún tratamiento previo a la coincubación con trofozoitos amibianos. Otro grupo control consistió del cultivo de células MDCK sin trofozoitos amibianos. Se coincubaron durante 30 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se lavaron las cámaras con PBS y se fijaron con paraformaldehído frío al 1% en PBS durante 12 min. Se lavaron con PBS y se retiraron las cámaras quedando la monocapa de células adherida sobre el portaobjetos. Se tiñeron las células con hematoxilina- eosina. Las zonas de desprendimiento celular fueron analizadas por microscopía y fotografiadas. Para evaluar la extensión del daño y el grado de inhibición lograda con el mAb se digitalizaron las fotografías y se analizaron por medio de un analizador de imágenes: NIH Image 1.47. Para el análisis con este programa se contrastaron y midieron las áreas correspondientes a células adheridas al cubreobjetos.

## RESULTADOS

1.- La fusión de células de bazo del ratón BALB/c hiperinmune con el mieloma produjo hibridomas secretores de anticuerpos.

### 2.- Producción del mAb:

Se obtuvieron 3 clonas positivas detectadas por ELISA: 4D-6, E6-18 y 75-4. Los valores obtenidos en las lecturas de ELISA fueron máximos para la clona 4D-6 por lo cual únicamente se trabajó con ella y se congelaron las otras clonas. El hibridoma 4D-6 fue expandido en cultivo y se produjo líquido de ascitis en ratones singénicos BALB/c. Los anticuerpos fueron semipurificados por precipitación en sulfato de amonio saturado.

La purificación por columnas de Sefarosa-Proteína A dio muy bajo rendimiento y la determinación del isotipo reveló que el mAb 4D-6 era IgG1, el cual tiene muy poca afinidad por proteína A.

### 3.- Naturaleza del epítipo reconocido:

#### a) Inmunoelectrotransferencias

Se realizaron inmunoelectrotransferencias utilizando un lisado completo amibiano, Fr.IV y FR. 16 como antígeno. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron tanto con ascitis como con sobrenadante de cultivo precipitado y observamos un reconocimiento específico de una banda de aproximadamente

30kDa (Fig.1). El control realizado con IgG normal de ratón no reconoció esta proteína.

La incubación previa de las tiras de nitrocelulosa con glicosidasas (digiere carbohidratos) y periodato (oxida carbohidratos) no afectó al reconocimiento antigénico, mientras que la tripsinización lo eliminó por completo (Fig.2). Con estos datos podemos afirmar que el mAb 4D-6 reconoce un epítotope de origen proteico.

**b) Inmunoprecipitaciones:**

Se realizaron inmunoprecipitados con el mAb 4D-6 acoplado a sefarosa y fracción IV inhibida con E-64. También se realizaron inmunoprecipitados con lisado amibiano completo fresco para ser analizado como zimograma en un gel de actividad para determinar si el antígeno reconocido por el mAb 4D-6 correspondía a una proteasa (Fig.3). En esta Figura 3 se encuentra que el mAb 4D-6 reconoce específicamente una proteína de 30 kDa con actividad de proteinasa. El control con IgG de ratón normal fue negativo.

**c) Inhibición de proteólisis por el mAb:**

Se encontró que el mAb 4D-6 inhibe parcialmente la digestión de la proteinasa amibiana (Fr.16) sobre azocaseína. En la figura 4 se observa la disminución del 65% de la actividad proteolítica del sobrenadante de la coincubación del mAb4D-6 con la Fr. 16 del HPLC, mientras que el control con anticuerpo normal de ratón no presentó inhibición de la actividad proteolítica.



**d) Colagenolisis por el inmunoprecipitado:**

La coincubación de la proteinasa inmunoprecipitada con colágena muestra bandas de degradación por debajo de las cadenas  $\alpha_2$  que aumentan de intensidad con el tiempo. Esta degradación fué inhibida por 0.1 mM E-64, un inhibidor de proteinasas de cisteína. La degradación fue activada por 10 mM 1-10 fenantrolina, activador de proteinasas de cisteína e inhibidor de metaloproteinasa. La proteinasa en ausencia de la fenantrolina, quelante de calcio, actúa más lentamente ya que el calcio del medio inhibe parcialmente a proteinasas de cisteína. El control negativo con anticuerpo normal de ratón no presentó degradación y el control positivo con colagenasa bacteriana mostró una degradación completa a tiempos cortos.

La figura 5 muestra la autoradiografía de de los productos de degradación de la colágena tritiada. Este estudio se realizó con 1.5, 2.5 y 20 horas de incubación del inmunoprecipitado del mAb con proteasa captada del lisado amibiano con la colágena. Se observan las cadenas  $\gamma$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  de la colágena. Se observa autodegradación mínima aun después de tiempos prolongados de incubación.

Estos datos son altamente sugestivos que el mAb reconoce a un epítoto exclusivo de amebapaina o bien que el epítoto reconocido sea compartido por amebapaina e histolisina y podría ser útil para localizar a la(s) enzima(s).

**4.- Inmunolocalización de la proteinasa:**

**a) Inmunofluorescencia in vitro:**

Se encontró que los trofozoitos amibianos presentan mucha heterogeneidad en la tinción lo cual posiblemente indica que hay diferencias cuantitativas en la expresión de la proteinasa en los trofozoitos. En la figura 6 se observa que algunas amibas presentan tinción en prácticamente toda su superficie, mientras que otras no tienen tinción y un tercer grupo tiene tinción en membrana de distinta extensión. Ocasionalmente también se observa el fenómeno de "parche" (capping). En algunos trofozoitos hay indicios de una distribución subcelular irregular. La heterogeneidad de la tinción aparentemente no está relacionada con el tamaño de la amiba.

**b) Inmunoperoxidasa in vivo:**

Se estudió la localización de la proteinasa amibiana en amibas HM-1 que habían producido abscesos hepáticos en el hamster de 1 a 48 horas de evolución. En la figura 7 se observan amibas de distintos tamaños rodeadas de leucocitos polimorfonucleares en los abscesos de 6 horas de evolución. El mAb revela que las amibas presentan gran heterogeneidad en la expresión de la proteinasa. Algunas amibas tienen tinción completa y algunas amibas presentan una tinción no uniforme de su superficie, hay mayor condensación de la tinción en algunas zonas. Esta focalización de la tinción se puede detectar con mayor precisión utilizando microscopía de Nomarski (7b).

**c) Inmuno-oro ultraestructural:**

La inmunocitología ultraestructural sobre una monocapa de amibas mostró que la amebapaina se encuentra principalmente en zonas claras amorfas del citoplasma, con alguna tinción sobre la zona fibrogranular y sobre la membrana de la amiba (Fig. 8). Con mayor aumento se observa que las partículas de oro se encuentran en zonas claras, translúcidas para electrones con "gránulos" blancos, sin membranas delimitantes. Estas zonas claras amorfas se encuentran distribuidas en forma heterogénea en el citoplasma del trofozoito. Ocasionalmente se puede observar que estas estructuras amorfas con intenso marcaje de inmuno-oro rodean a una vesícula.

En la preparación control, en donde se utilizó un anticuerpo no relacionado, no se observa tinción específica (Fig. 8E).

Como *E. histolytica* es capaz de fagocitar y digerir eritrocitos humanos muy eficientemente, se analizó una posible redistribución del antígeno del mAb 4D-6 después de la eritrofagocitosis. Se encontró que después de la eritrofagocitosis las proteasas se desplazan hacia la cercanía de los eritrocitos y parcialmente se depositan sobre los eritrocitos fagocitados (Fig. 9). El marcaje se distribuye de manera uniforme y en cantidades parecidas sobre todos los eritrocitos. La cuantificación del inmunomarcaje reveló que hay 1.5 veces más marcaje sobre eritrocitos fagocitados que en las zonas claras amorfas en la cercanía de los eritrocitos. Con un aumento mayor se

observa que las zonas con marcaje de inmuno-oro entran en contacto cercano con membranas de los eritrocitos. (Es de interés notar que la amebapaina no se encuentra incorporada a alguna estructura vesicular con membranas delimitantes, por lo cual es muy sugestivo que la proteinasa en el citoplasma amibiano se encuentra en forma inactiva o como proenzima).

En preparaciones de control de la ultraestructura amibiana se encuentran los mismos detalles del citoplasma de los trofozoitos descritos en la literatura (Mártinez Palomo, 1982, 1986). En la figura 10 se pueden encontrar las vacuolas fagocíticas, tanto las macropinocíticas como las micropinocíticas y las vesículas de distintos tamaños, algunas con restos de membranas en su interior. Se observan componentes ultraestructurales del núcleo y citoplasma del trofozoito como los cuerpos esferoidales refringentes intranucleares descritos por Chévez (1971), el huso microtubular intranuclear y ribosomas helicoidales correspondientes al cuerpo cromatoide en el citoplasma. Junto con estos detalles nucleares y citoplasmáticos se observan con claridad las zonas claras amorfas correspondientes a las zonas en donde se observó la localización del marcaje de inmuno-oro. Posterior a la eritrofagocitosis se observan estas zonas claras amorfas en la cercanía de los eritrocitos de manera similar a la observada en preparaciones de eritrofagocitosis procesadas para la tinción de inmuno-oro. La persistente presencia de

estas zonas claras amorfas sin membrana limitante, conservada a pesar de utilizar distintas técnicas de fijación, postfijación, inclusión y contrastación en la preparación de las muestras para microscopía electrónica, excluye la posibilidad de que se pudiera tratar de un artefacto debido a la técnica.

**5.- Efecto del mAb sobre la actividad citopática de *E. histolytica*:**

Las células MDCK forman una monocapa confluyente, la cual no sufre alteraciones durante el transcurso del experimento en ausencia de amibas. La monocapa de MDCK expuesta durante 30 minutos a trofozoitos HM-1 presenta grandes áreas de desprendimiento de la monocapa (Fig.11b). El cultivo de células MDCK expuesta a trofozoitos amibianos en presencia del mAb 4D-6 presenta una inhibición importante del desprendimiento de la monocapa (Fig.11c). Las zonas de desprendimiento celular son más reducidas tanto en tamaño como en número. La coincubación en presencia del inhibidor de proteinasas E-64 presenta una inhibición casi total del daño de las proteinasas amibianas sobre la monocapa MDCK (Fig.11d). Los escasos sitios de desprendimiento de la monocapa son casi indistinguibles de los cultivos control, sin trofozoitos amibianos. En presencia de un ascitis control, no hubo inhibición del efecto citopático y se observaron extensas zonas de desprendimiento, parecidas a los cultivos con trofozoitos amibianos sin inhibidores. El

resultado del programa de análisis de imágenes sobre la extensión del daño inducido a la monocapa MDCK por trofozoitos amibianos se encuentra en la Tabla 4.

Tabla 4

-----

A: Monocapa intacta  
B: Monocapa + amibas  
C: Monocapa + amibas + mAb (4D-6)  
D: Monocapa + amibas + E-64

-----

Lectura	% Monocapa	% Daño	% Inhibición
A: (255)	100	0	-
B: (127)	49	51	-
C: (194)	76	24	55
D: (214)	83	17	69

-----

El mAb 4D-6 logra un 55% inhibición del daño a la monocapa MDCK inducida por trofozoitos de *E. histolytica*.

## DISCUSION

Se produjo un mAb contra una proteinasa de cisteína de 30 kDa de *E. histolytica* altamente purificada. Este anticuerpo reaccionó con un epítipo en la enzima con actividad proteolítica, ya que fue capaz de inhibir específicamente la digestión de azocaseína por la proteinasa encontrada en la fracción IV (Fig. 4) y la proteína inmunoprecipitada mostró actividad proteolítica en una electroforesis en gel de sustrato (Fig. 3). Los resultados de las inmunoprecipitaciones, inmunoelctrotransferencias y electroforesis en gel de sustrato mostraron que el antígeno reconocido por el mAb 4D-6 tiene un peso aproximado de 30 kDa (Figs. 1,2 y 3). Como se han descrito tres genes que codifican para enzimas proteolíticas con el mismo peso molecular de 30 kDa (Reed *et al.*) y al menos dos proteinasas que son muy similares entre si han sido purificadas (Luaces y Barrett, 1988, Scholze y Schulte 1988), intentamos distinguir contra cual de ellas estaba dirigido el anticuerpo monoclonal mediante la capacidad de poder digerir colágena nativa tipo I, lo cual únicamente ha sido descrito para la amebapaina (Schulte y Scholze 1989). El antígeno inmunoprecipitado por el mAb sí presentaba la capacidad de digerir colágena nativa de rata de una manera muy parecida a la descrita para la amebapaina (Schulte y Scholze 1989) encontrándose que la cadena- $\alpha_2$  es la más susceptible a ser degradada, seguida por los componentes  $\beta$

y  $\gamma$ , mientras que la cadena- $\alpha_1$  es la más resistente a la degradación (Fig. 5). Este efecto, el cual es aun más notorio después de 20 horas de incubación, podía ser inhibido por E-64 y activado por 1-10 fenantrolina, lo cual es característico para proteinasas de cisteína. Con estos datos concluimos que el mAb reconocía un epítotope de la amebapaina o bien un epítotope compartido entre amebapaina e histolisina. Hay que tomar en consideración esta última posibilidad ya que las proteinasas amebapaina e histolisina tienen una homología del 81% de su secuencia de aminoácidos (Tannich et al., 1992) y ambas proteínas pueden tener una estructura muy similar, ya que ambas pertenecen a la superfamilia de la papaina. No se puede excluir la posibilidad que el mAb también reconozca a un producto proteico similar a la catepsina del gene recientemente descrito por Reed et al. (1993) en una cepa de *E. histolytica* HM1:IMSS, sin embargo será necesario obtener más información acerca de la abundancia relativa y la funcionalidad de este producto génico antes de considerarlo importante.

En un trabajo previo se demostró, mediante anticuerpos policlonales hechos contra una proteínasa de cisteína de 30 kDa, una heterogeneidad en el marcaje inmunofluorescente de la superficie celular con condensación del antígeno en algunas zonas de la superficie celular (Montfort et al., 1994). Estos datos se confirman con el mAb, tanto en los trofozoitos en cultivo in vitro (Figs. 6 ) como para los



trofozoitos en hígado de hamster (Figs. 7). La heterogeneidad en la distribución del antígeno reconocido por el mAb sugiere que la proteinasa se encuentra con mayor abundancia en algunos compartimientos subcelulares amibianos. En un trabajo previo se ha estudiado la distribución subcelular de la proteinasa en trofozoitos utilizando dos procedimientos bioquímicos de fraccionamiento (Ostoa-Saloma et al., 1989). En ese estudio se encontró que la actividad proteolítica se encontraba distribuida en diferentes fracciones y la proteinasa de 30 kDa se encontraba asociada a vesículas internas y la membrana plasmática. Estas proteínas se comportaban como moléculas hidrofóbicas en un ensayo de separación de fases de tritón X-114. Existe un reporte con datos contradictorios en el cual se propone una distribución subcelular distinta, ya que se describe que las proteinasas de bajo peso molecular se encuentran principalmente en la fracción citoplasmática (Meester et al., 1990). En ese trabajo se asumió que el diazopeptidil, un inhibidor de proteinasas, marcaba específica y exclusivamente a todas las proteinasas de cisteína de los trofozoitos amibianos. Estos datos no fueron confirmados con la medición de la actividad proteolítica de las bandas observadas en los geles, por lo cual no se comprobó la función de proteinasas de las proteínas unidas al inhibidor. En un estudio inmunocitológico preliminar, en el cual se utilizó un anticuerpo poli-clonal dirigido contra

amebapaina, se encontró que esta se localizaba en estructuras parecidas a la matriz celular y en vesículas fagocíticas internas (Scholze et al., 1992). Sin embargo, este estudio únicamente se realizó en trofozoitos después de la fagocitosis. La observación es consistente con el estudio de Ostoa Saloma et al. (1989).

En el presente estudio se analizó la localización subcelular del antígeno reconocido por el mAb por medio de microscopía electrónica tanto en el estado basal del trofozoito como después de la eritrofagocitosis. Se encontró que el antígeno se localizaba predominantemente en zonas claras, amorfas del citoplasma de los trofozoitos (Figs 8 A-D). Algo de marcaje se pudo observar en vacuolas y en membrana, lo cual es consistente con nuestros datos previos y con el reporte de Scholze et al. (1992), pero no se observó prácticamente nada de marcaje en el citoplasma electrodenso. Surge la duda acerca de la naturaleza de las zonas amorfas claras, sin membrana limitante, con alta concentración de proteasa. Se excluye la posibilidad de un artefacto de la técnica, ya que estas estructuras con alto marcaje de la proteasa se conservan con el uso de varias metodologías de inmunocitología ultraestructural, las cuales se utilizaron en forma consecutiva para favorecer tanto el inmuno-marcaje como también la visualización óptima de membranas (Figs. 10 A-C). Mediante la variación en las metodologías de postfijación, inclusión y contrastación se observó que las zonas claras amorfas, sin

membranas, siempre formaban parte importante del citoplasma. Lo que sí se logró mediante estas variaciones técnicas, es obtener los detalles finos de las estructuras citoplasmáticas y del núcleo descritas en la literatura (Martínez-Palomo, 1986) sin embargo no hubo modificaciones en las zonas del inmuno-marcaje independientemente de la metodología utilizada. Muchas de estas zonas claras se encuentran en la cercanía de vacuolas fagocíticas y de vesículas de distintos tamaños.

Se observó una redistribución del marcaje en los trofozoitos posterior a la eritrofagocitosis, ya que el marcaje se translocó al interior de las vesículas fagocíticas (Fig. 9A). En algunas zonas se observa un contacto muy cercano entre las zonas claras amorfas con alto marcaje de la proteasa y las membranas de las vesículas conteniendo a eritrocitos fagocitados (Figs. 9 B y C), lo cual sugiere que el trofozoito tiene a la proteinasa en una especie de compartimiento subcelular (posiblemente para impedir la autodigestión) y que la proteinasa puede ser liberada a las vesículas fagocíticas. Estos datos son sugestivos de que este compartimiento llenaría la función de un "lisosoma". Es notable que no se observan membranas que delimiten a estas zonas claras amorfas del citoplasma mas electrodensos. Aun se desconocen las propiedades fisico-químicas y bioquímicas de estos excepcionales organelos y será de interés estudiarlos.

Las proteinasas de cisteína de *E. histolytica* provocan el desprendimiento y redondeamiento de células que crecen en monocapa (Keene et al., 1986; Luaces y Barrett, 1988). El líquido de ascitis con el mAb presentó la capacidad de inhibir parcialmente el efecto citopático que ejercen los trofozoitos amibianos sobre células MDCK (Fig. 11). La capacidad inhibitoria fue menor que la de E-64, un inhibidor general de proteinasas de cisteína el cual protegió casi por completo a la monocapa de células en cultivo del efecto citopático de los trofozoitos amibianos. El efecto protector del líquido de ascitis con el mAb también fue mucho más importante que la de un líquido de ascitis control, lo cual indica que una parte importante del efecto citopático de los trofozoitos amibianos sobre monocapas de células es debido a la o las proteinasas de cisteína reconocidas por el mAb. Estos datos sugieren que las proteinasas de cisteína de los trofozoitos amibianos son los primordialmente responsables del efecto citopático de las amibas sobre monocapas de células en cultivo.

## REFERENCIAS

- Abd-Alla, M.D., Jackson, T.F.H.G., Gathiram, V., El-Hawey, A.M., Ravdin, J.I. (1993). Differentiation of pathogenic from non-pathogenic *Entamoeba histolytica* infection by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2845-2850.
- Aley, S.B., Scott, W.A. and Cohn, Z.A. (1980). Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **152**, 391-404.
- Avila, E. E., Sánchez-Garza, M. y Calderón, J. (1985). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*: sulhydryl-dependent proteolytic activity. *J. Protozool.* **32**, 163-166.
- Avila, E. E y Calderón J. (1993). *Entamoeba histolytica* trophozoites: a surface-associated cysteine protease. *Exp. Parasitol.* **76**, 232-241.
- Barrett, A. J. (1986). An introduction to the proteinases. In *Proteinase inhibitors*, ed. A.J. Barrett, G. Salvesen, pp.3-22. Amsterdam : Elsevier Science.
- Becker, I., Pérez-Tamayo, R., Montfort, I., Alvizouri, A. M. and Pérez-Montfort, R. (1989). *Entamoeba histolytica*: role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. *Exp. Parasitol.* **67**, 268-280.
- Bendayan, M. and Zollinger, M. (1983). Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 101-109.
- Bos, H. J. (1979a). Cell biological analysis of parasite-host cell interactions. II. Cell surface, phagocytosis and virulence of *Entamoeba histolytica*, a review. *Acta Leiden* **47**, 23-25.
- Bos, H. J. (1979b). *Entamoeba histolytica*: cytopathogenicity of intact amebae and cell-free extracts; isolation and characterization of an intracellular toxin. *Exp. Parasitol.* **47**, 369-377.

Bos, H. J., Leijendekker, W. J. and van den Eijk, A. A. (1980). *Entamoeba histolytica*: cytopathogenicity, including serum effects on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayers. *Exp. Parasitol.* 50, 342-348.

Brumpt, E. (1925) Étude sommaire de l'"*Entamoeba dispar*" n.sp. Amibe à kystes quadri-nuclées, parasite de l'homme. *Bulletin de l'Académie de Médecine (Paris)*, 94, 943-952.

Caballero-Salcedo, A., Viveros-Rogel, M., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepúlveda-Amor, J., Gutierrez, G., Ortiz-Ortiz, L. (1994). Seroepidemiology of Amebiasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50(4), 412-419.

Causton, B. E. (1985). The choice of resins for electron immunocytochemistry. In *Immunolabelling for electron microscopy* (ed. J. M. Polak and I.M. Varndell), pp. 29-36, Elsevier Science Publishers B. V., The Netherlands.

Chávez, A., Segura, M., Iturbe, I. y Aubanel, M. (1971). Aspectos morfológicos en la biología del trofozoito de *Entamoeba histolytica* desde el punto de vista de la citología dinámica. *Arch. Inves. Med. (Mexico)*, 2, Suppl. 1, 229-244.

Clark, C.G. and Diamond, L.S. (1994). Pathogenicity, Virulence and *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Today*. 10(2), 46-47.

Councilman, W. T. and LaFleur, H.A. (1891). Amoebic dysentery, *Johns Hopkins Hosp. Rep.* 2, 395-548.

Deas, J.E., y Miller, J.H. (1977). Plasmalemmal modifications of *Entamoeba histolytica* in vivo. *J. Parasitol.*, 63, 25-31.

de Meester, F., Shaw, E., Scholze, H., Stolarsky, T. and Mirelman, D. (1990). Specific labeling of cysteine proteinases in pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 58, 1396-1401.

Diamond, L. S. (1961). Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science*, 134, 336-337

Eaton, R..D.P., Meerovitch, E. and Costerton, J.W. (1969). A surface-active lysosome in *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63, 678-680.

- Eaton, R.D.P., Meerovitch, E. and Costerton, J.W. (1970). The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **64**, 299-304.
- Gadasi, H. and Kessler, E. (1983). Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **39**, 528-531.
- Gadasi, H. and Kobliger, D. (1983). *Entamoeba histolytica*: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp. Parasitol.* **55**, 105-110.
- Gathiram, V., Jackson, T.F.H.G. (1985). Frequency distribution of *E. histolytica* zymodemes in a rural South African population. *Lancet* **I**, 719-721.
- Ghadirian, E. and Meerovitch, E. (1978). Behaviour of axenic IP-106 strain of *Entamoeba histolytica* in golden hamster. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 241-247.
- Guarner, V. (1990). History of amebiasis. Kretschmer RR. ed. *Amebiasis: Infection and Disease by Entamoeba histolytica*. Boca Raton, Fl: CRC Press. 2-10
- Keene, W. E., Petitt, M. G., Allen, S. and McKerrow, J. H. (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **163**, 536-549.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (London)* **256**, 495
- Langone, J.J. (1982). Protein A of *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. *Adv. Immunol.* **32**: 157-251
- Lefevre, M. F., Flegler, A. and Claeys, A. E. (1979). Evaluation of a rapid and specific assay for determination of collagenolytic activity in biological samples. *Clin. Chim. Acta* **92**, 167-175.
- Leippe, M., Bahr, E., Tannich, E., Horstmann, R.D. (1993). Comparison of pore-forming peptides from pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 101-110.
- Long-Krug, S.A., Fisher, K.G., Hysmith, R.M., and Ravdin, J.I. (1985). Phospholipase A enzymes of *Entamoeba*

*histolytica*: description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.* 152, 536-541.

Luaces, A. L and Barrett, A. J. (1988). Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 250, 903-909.

Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Pittman, J.C., Hofbauer, A.F. and Pittman F.E. (1976). Studies on amebiasis. V. Ultrastructural study of invasive and digestive processes in *Entamoeba histolytica*: Correlation of freeze-etch replicas and thin sections with enzyme histochemistry. *Proceedings of the International Conference on Amebiasis*, Ed. B. Sepúlveda and L.S. Diamond, pp. 250-260. IMSS, México, D.F.

Lushbaugh, W. B., Kairalla, A. B., Cantey, J. R., Hofbauer, A. F., Pittman, J. C. and Pittman, F. E. (1978) Cytotoxicity of a cell free extract of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 9, (suppl. 1), 233-236.

Lushbaugh, W. B., Kairalla, A. B., Cantey, J.R., Hofbauer, A. F. and Pittman, F. E. (1979). Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 139, 9-17.

Lushbaugh W. B., Hofbauer, A. F. and Pittman, F. E. (1985). *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. *Exp. Parasitol.* 59, 328-336.

Lynch, E. C., Rosenberg, I.M., Gilter, C. (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* 1. 801-804.

Martínez-Palomo, A. (1982). Cell Biology, en *The Biology of Entamoeba histolytica*, Martínez-Palomo, A., Ed., RSP, England, 5-59.

Martínez-Palomo, A. (1986). Biology of *Entamoeba histolytica*, en *Amebiasis*, Martínez-Palomo, A., Ed., Elsevier Biomedical, Amsterdam, 11-43

McKerrow, J. H., Sun, E., Rosenthal, P. and Bouvier, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev. Microbiol.* 47, 821-853.



McLaughlin, J. and Faubert, G. (1977). Partial purification and some properties of a neutral sulfhydryl and an acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Can. J. Microbiol.* 23, 420-425.

McLaughlin, J. and Aley, S. (1985). The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J. Protozool.* 32, 221-240.

McGowan, K., Denecke, C. F., Thorne, G. M. and Gorbach, S.L. (1982). *Entamoeba histolytica* cytotoxin: purification, characterization, strain virulence, and protease activity. *J. Infect. Dis.* 146, 616-625.

Montfort, I., Ruiz-Argüelles, A. and Pérez-Tamayo, R. (1992). Phenotypic heterogeneity in the expression of a 30 kDa cysteine proteinase in axenic cultures of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 23, 99-103.

Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., Pérez-Montfort, R., González Canto, A. and Olivos, A. (1994). Purification and immunologic characterization of a 30 kDa cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* 80, 607-613

Muñoz, M. L., Calderón, J. and Rojkind, M. (1982). The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 155, 42-51.

Muñoz, M. L., Rojkind, M., Calderón, J., Tanimoto, M., Arias-Negrete, S. and Martínez-Palomo, A. (1984). *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *J. Protozool.* 31, 468-470

Muñoz, M. L., Lamoyi, E., León, G., Tovar, R., Pérez-García, J., et al. (1990). Antigens in electron-dense granules from *Entamoeba histolytica* as possible markers for pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2418-24

Ostoa-Saloma, P., Cabrera, N., Becker, I. and Pérez-Montfort, R. (1989). Proteinases of *Entamoeba histolytica* associated with different subcellular fractions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32, 133-144.

Pérez-Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velázquez-Medina, L., Montfort, I. and Becker, I. (1987). Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 26, 87-97.

Pérez-Tamayo, R. (1986), Pathology of amebiasis. *Amebiasis*, Martínez-Palomo, A., Ed., Elsevier Biomedical, Amsterdam, 45-94

Petri, J.I. (1987). Isolation of the galactose binding lectin that mediates the *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* **80**, 1238-1244.

Petri, W.A. Jr. Jackson, T.F.H.G., Gathiram, V., et al. (1990). Pathogenic and non-pathogenic 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., Clark, C.G. and Diamond, L.S. (1994). Host-parasite relationships in amebiasis. *J. Infect. Dis.* **169**, 483-484.

Ragland, B.D., Vaux, D. and Petri W.A. Jr. (1994). DNA fragmentation of target cells killed by *Entamoeba histolytica* has a pattern characteristic of apoptosis. *Clin. Res.* **42**, 284A.

Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Guerrant, R. L. and Long-Krug, S.A. (1985). Effects of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **152**, 542-549.

Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R.L. & Hewlett, E.L. (1985). The N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*: I. Partial purification and relationship to amebic *in vitro* virulence. *J. Infect. Dis.* **151**, 804-816.

Ravdin, J.I. (1989). *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. *J. Infect. Dis.* **159**, 420-429.

Ravdin, J.I., Jackson, T.F.H.G., Petri, W.A. et al. (1990). Association of serum anti-adherence lectin antibodies with invasive amebiasis and asymptomatic pathogenic *Entamoeba histolytica* infection. *J. Infect. Dis.* **162**, 768-772.

Reed, S., Bouvier, J., Pollack, A. S., Engel, J. C., Brown, M., Hirata, K., Que, X., Eakin, A., Hagblom, P., Gillin, F. and McKerrow, J. H. (1993). Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica*: pathogenic strains possess a unique cysteine proteinase gene. *J. Clin. Invest.* **91**, 1532-1540.

Rondanelli, E.G., Carosi, G., Filice, C., Carnevale, G., Scaglia, M. and Barbarini. (1977). Ultrastructura di *Entamoeba histolytica*. *Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie*. 29, 592-606.

Rosenbaum, R.M. and Wittner, M. (1970). Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J. Cell Biol.* 45, 367-382.

Rosenberg, I., et al. (1989). Isolation, characterization, and partial purification of a transferable membrane channel (amebopore) produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 237-248.

Sasaki, T. and Ueno-Matsuda, E. (1993). Cystein-proteinase localization in osteoclasts: an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 271, 177-179.

Schaudinn, F. (1903). Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. *Arb. Kaiserl. Ges.* 19, 547-576.

Scholze, H. and Werries, E. (1984). A weakly acidic protease has a powerful proteolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11, 293-300.

Scholze, H., Werries, E. (1986). Cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and action on different enzymes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 103-112.

Scholze, H. and Schulte, W. (1988). On the specificity of a cysteine proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Biomed. Biochim. Acta* 47, 115-123

Scholze, H., Schulte, W. (1990). Purification and partial characterization of the major cystein protease from *Entamoeba histolytica*. *Biomed. Biochem. Acta* 49, 455-463

Scholze, H. (1991). Amebapain, the major proteinase of pathogenic *Entamoeba histolytica*. In *Biochemical Protozoology* (ed. G. Coombs and M. North) pp. 251-256. Taylor and Francis, London.

Scholze H., Löhden-Bendinger, U., Müller, G. and Bakker-Grunwald, T. (1992). Subcellular distribution of amebapain, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 23, 105-108.

- Schulte, W., Scholze, H. and Werries, E. (1987). Specificity of a cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* towards the  $\alpha$ 1-CB2 peptide of bovine collagen type I. *Mol. Biochem. Parasitol.* **25**, 39-43.
- Schulte, W. and Scholze, H. (1989). Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *J. Protozool.* **36**, 538-543.
- Serrano, R., Deas, J.E. and Warren, L.G. (1977). *Entamoeba histolytica*: Membrane fractions. *Exp. Parasitol.* **41**, 370-384.
- Stilwell, G.G. (1955). Amebiasis: its early history. *Gastroenterology* **28**, 606-622.
- Takeuchi, A. and Phillips, B.P. (1975). Electron microscopy study of experimental *Entamoeba histolytica* infections in the guinea pig. I. Penetration of the intestinal epithelium by trophozoites. *J. Trop. Med. Hyg.* **24**: 34-48.
- Tannich, E., Horstman, R.D., Knobloch, J. & Arnold, H.H. (1989). Primary Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 5118-5122.
- Tannich, E. & Bruchhaus, I.; Walter, R.D. & Horstman, R.D. (1991a). Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: Identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 61-72.
- Tannich, E., Scholze, H., Nickel, R. y Horstman, R. D. (1991). Homologous cysteine proteinases of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: differences in structure and expression. *J. Biol. Chem.* **266**, 4798-4803.
- Tannich E., Nickel, R., Buss, H. and Horstmann, R. D. (1992). Mapping and partial sequencing of the genes coding for two different cysteine proteinases in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**, 109-112.
- Treviño-García Manzo, N., Feria-Velasco, A., Ruiz de Chávez, I. y de la Torre, M. (1971). Lisosomas en *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* **2**, 179-186.

Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F. and Martínez-Palomo, A. (1984). Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 117, 81-91.

Walsch, 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

Walsch, J.A. (1988). Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. Ravdin J.I. ed. *Amebiasis: Human Infection by Entamoeba histolytica*. New York: Wiley & Sons. 838

Woodward, M.P., Young, W.W. Jr. and Bloodgood, R.A. (1985). Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J. Immunol. Methods* 78, 143-153.

Young, J.D.E., Young, T.M., Lu, L.P., Unkeless, J.C. & COHN, Z.A. (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 156, 1677-1690.

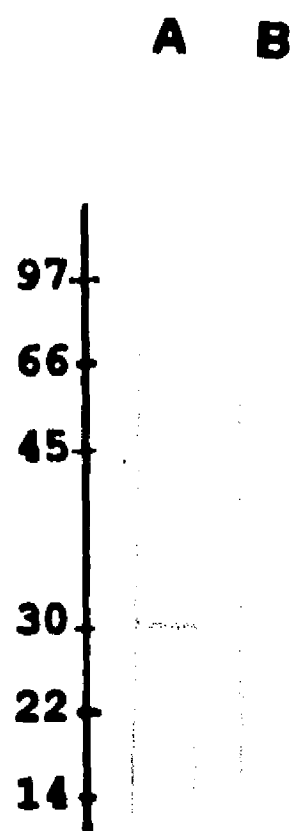
Zimmermann, S., Becker-Perez, I., Beuscher, H. U., Kroczeck, R. A., Röllinghoff, M. and Solbach, W. (1994). *Leishmania* major parasites share an epitope with the murine CD3-T receptor complex. *Eur. J. Immunol.* 24, 503-507.

## FIGURAS

Fig.1

Inmunoelectrotransferencia (Westernblot) del antígeno reconocido por el mAb 4D-6.

Se separaron los lisados de los trofozoitos de *E. histolytica* por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La tira en el carril A se incubó con el mAb 4D-6 precipitado con sulfato de amonio y la tira del carril B se incubó con IgG normal de ratón en las mismas condiciones. Después de un lavado se incubaron ambas tiras con el anticuerpo secundario de conejo anti- IgG (H+L) de ratón en condiciones idénticas. Después de un lavado se reveló la peroxidasa con DAB (diaminobenzidina) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se observa el reconocimiento antigénico de 30 kDa en el carril A.

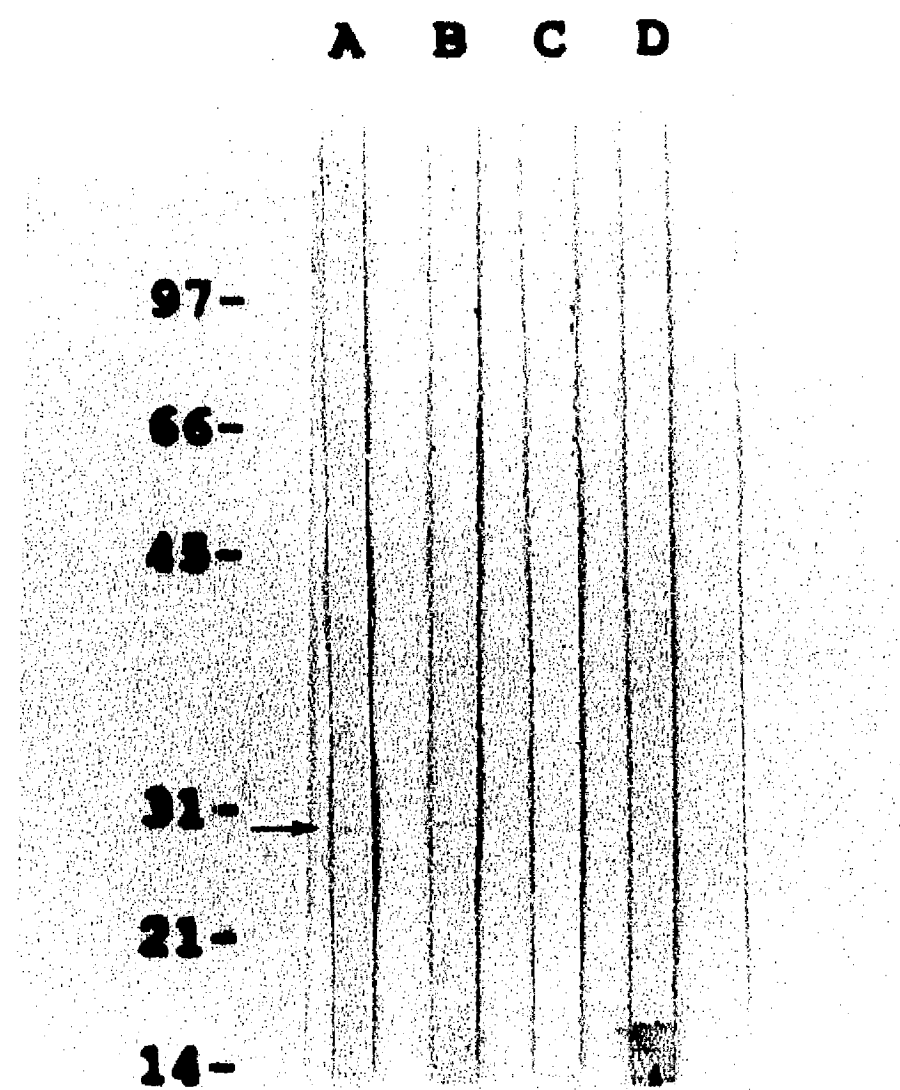


FALLA DE ORIGEN

**Fig.2**

**Digestión de carbohidratos y proteínas en Western Blot**

Las tiras de nitrocelulosa transferidas con el lisado amibiano descrito en la fig.1 fueron incubadas con glicosidasas, periodato de sodio y tripsina. El carril A a corresponde a una tira de nitrocelulosa incubada con el mAb. Se observa un reconocimiento antigénico de 30 kDa (ver flecha). La tira de nitrocelulosa del carril B fué pretratada con glicosidasas y la del carril C con periodato de sodio antes de ser incubadas con el mAb. En ambas se observa que persiste el reconocimiento antigénico observado en el carril A. La tira del carril D fué pretratada con tripsina y se observa la pérdida del reconocimiento antigénico. Estos datos confirman la naturaleza proteica del antígeno.



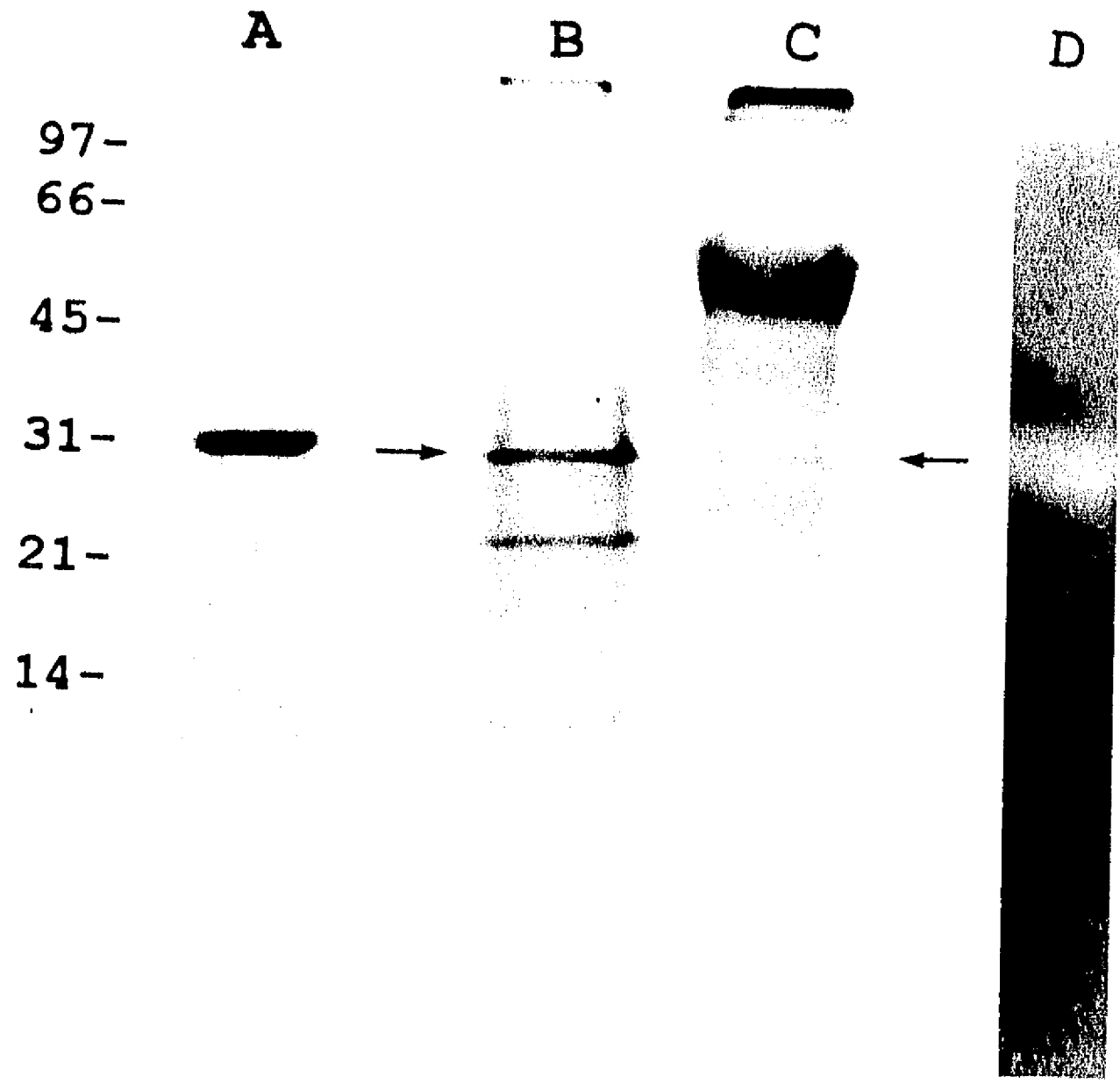
**Fig.3**

**Análisis de SDS-PAGE de las fracciones que contienen la  
proteínasa de 30 kDa.**

El carril A corresponde a la Fr. 16 contra la cual fue hecho el mAb. En el carril B se observa el perfil proteico de la FR. IV, que contiene la Fr. 16 (ver flecha) además de otras proteínas de pesos moleculares de rango amplio. El carril C muestra el resultado del inmunoprecipitado realizado con el mAb 4D-6 y la fracción IV, en donde se observa un claro reconocimiento específico de la Fr. 16 con peso molecular de 30 kDa (ver flecha), una de las dos bandas principales de la FR. IV. La banda intensa con peso de 50 kDa observada en el carril C corresponde a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se pueden apreciar como una banda ancha entre 23 y 28 kDa. En el carril D se observa el análisis del inmunoprecipitado en una electroforesis en gel de sustrato sobre gelatina. El zimograma del mAb 4D-6 con un lisado amibiano fresco completo muestra que la proteína reconocida por el mAb corresponde a una proteínasa de 30 kDa que tiene la capacidad de digerir gelatina. Se observa una zona de lisis con en peso de aproximadamente 30 kDa.



FIG. 3



FALLA DE ORIGEN

Fig.4

Inhibición de la digestión de azocaseína por el mAb

Diluciones seriadas 1:2 con sefarosa 4D-6 ( ) o con sefarosa IgG normal de ratón ( ) fueron incubadas con 200 ul de la fracción 16 (50 ug proteína por muestra). La muestra mas concentrada contenía 1 ml de sepharosa 4D-6 en un volumen final de 1.2 ml con fracción 16 y el testigo contenía 1 ml PBS y 200 ul de fracción 16. Se incubaron las muestras en un balancín durante 3 hrs a 4°C y se incubaron 200 ul del sobrenadante con 1 mg de azocaseína durante 3 horas a 37°C. Se calculó la inhibición específica ( ) restando los valores obtenidos con el mAb 4D-6 de los valores correspondientes al control de IgG normal de ratón. La inhibición específica que se obtuvo fué del 65%.

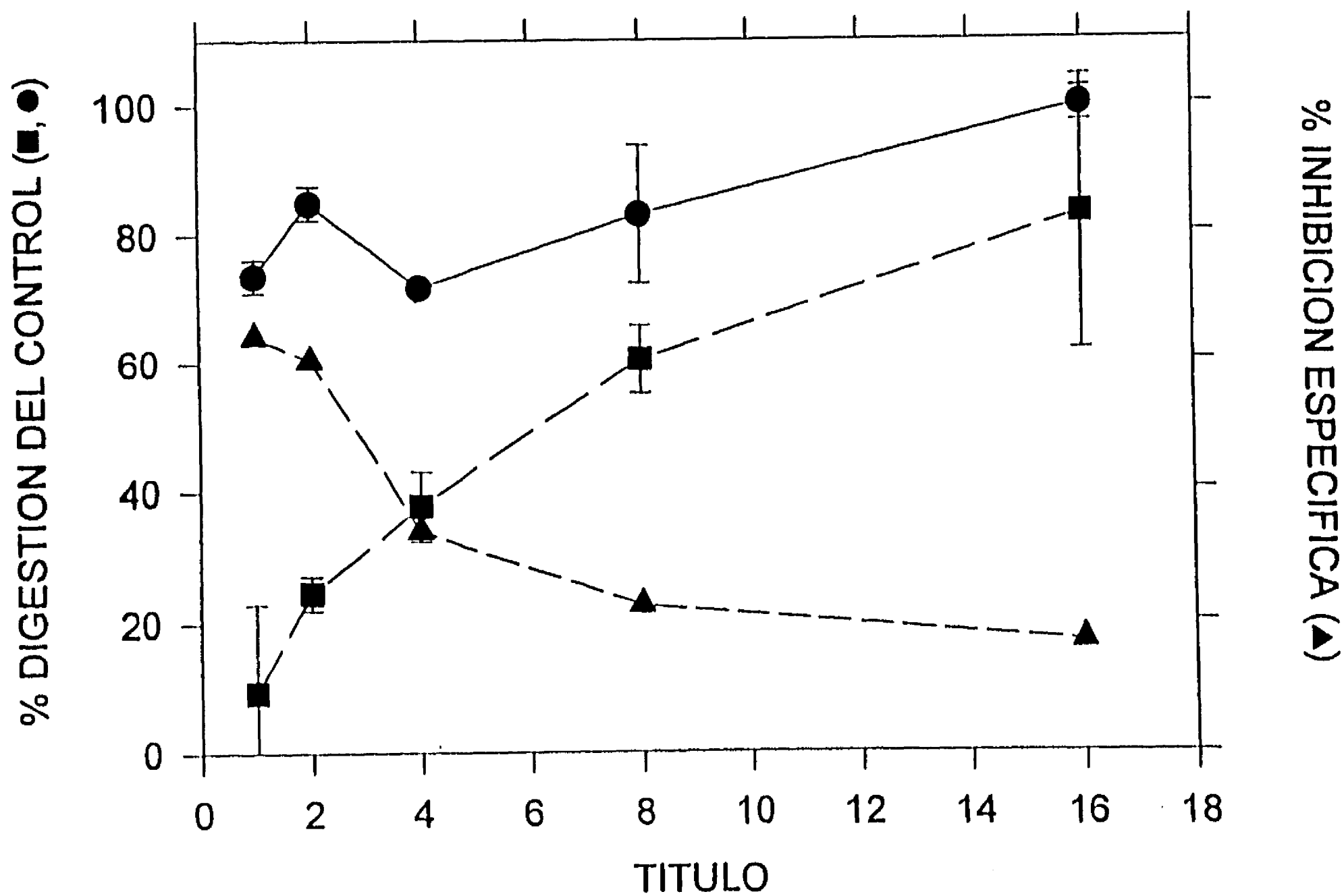


Fig.5 Autoradiografías de la digestión de colágena nativa tipo I de cola de rata por el antígeno reconocido por el mAb 4D-6 en el inmunoprecipitado.

Este estudio se realizó con 1.5, 2.5 y 20 horas de coincubación. Se observan las cadenas  $\gamma$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  de la colágena tipo I marcadas en la izquierda. En los carriles A, E, I se observa la autodegradación espontánea de la colágena a los tiempos 1.5, 2.5 y 20 horas respectivamente. Se observa autodegradación mínima aun después de tiempos prolongados de incubación. Los carriles B, F y J muestran la coincubación de la proteinasa inmunoprecipitada y la colágena. Se observan que aparecen bandas de degradación por debajo de las cadenas  $\alpha_2$  que aumentan de intensidad con el tiempo. La degradación progresiva de la colágena es mayor a las 20 horas. Esta degradación es inhibida en la presencia de 0.1 mM E-64, observada en los carriles C, G y K. No se observa degradación aun después de 20 horas de coincubación. La degradación fue activada por 10 mM 1-10 fenantrolina, observada en los carriles D, H y L. A las 20 horas se observa que la intensidad de las 5 bandas de colágena había disminuido considerablemente.

FIG. 5

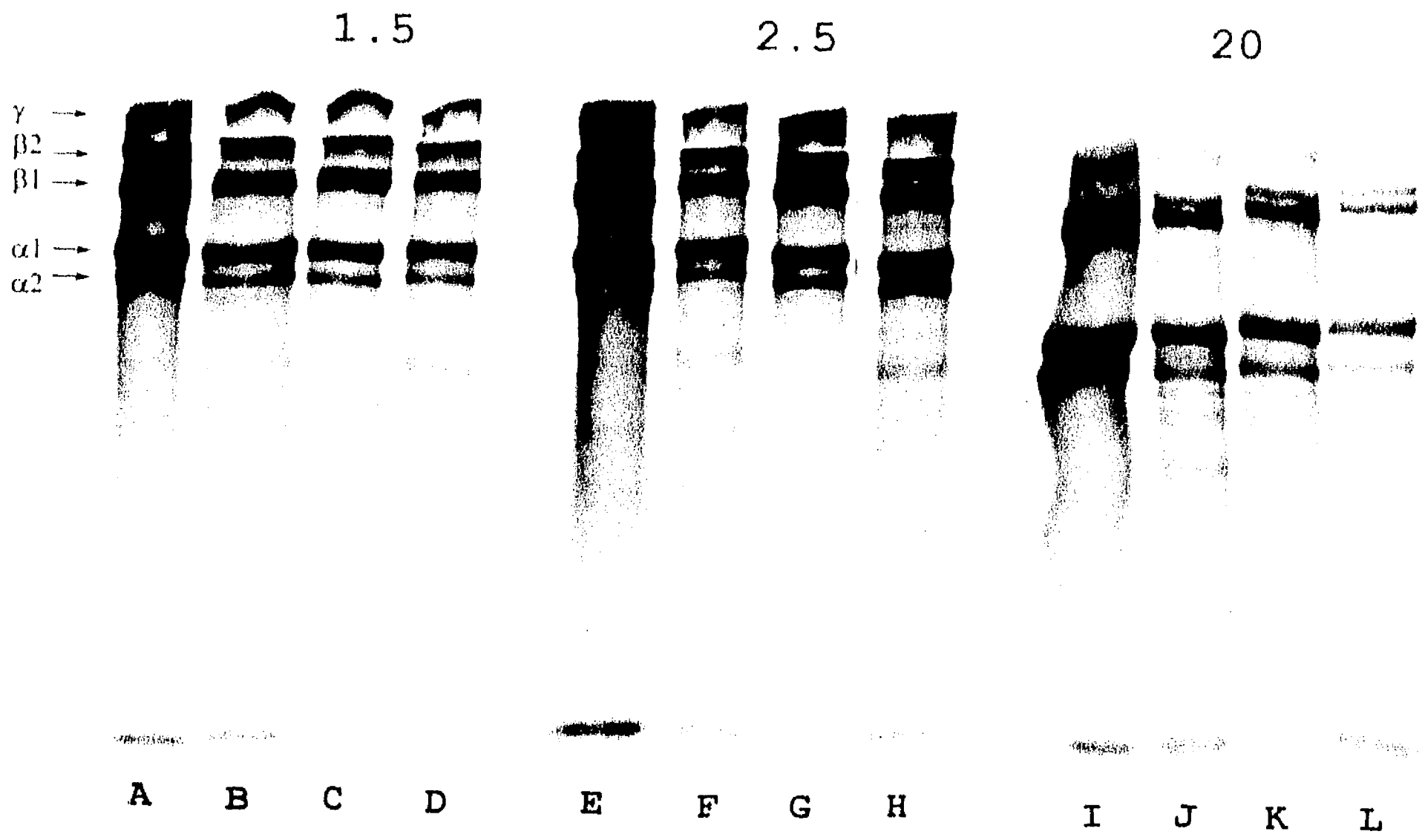
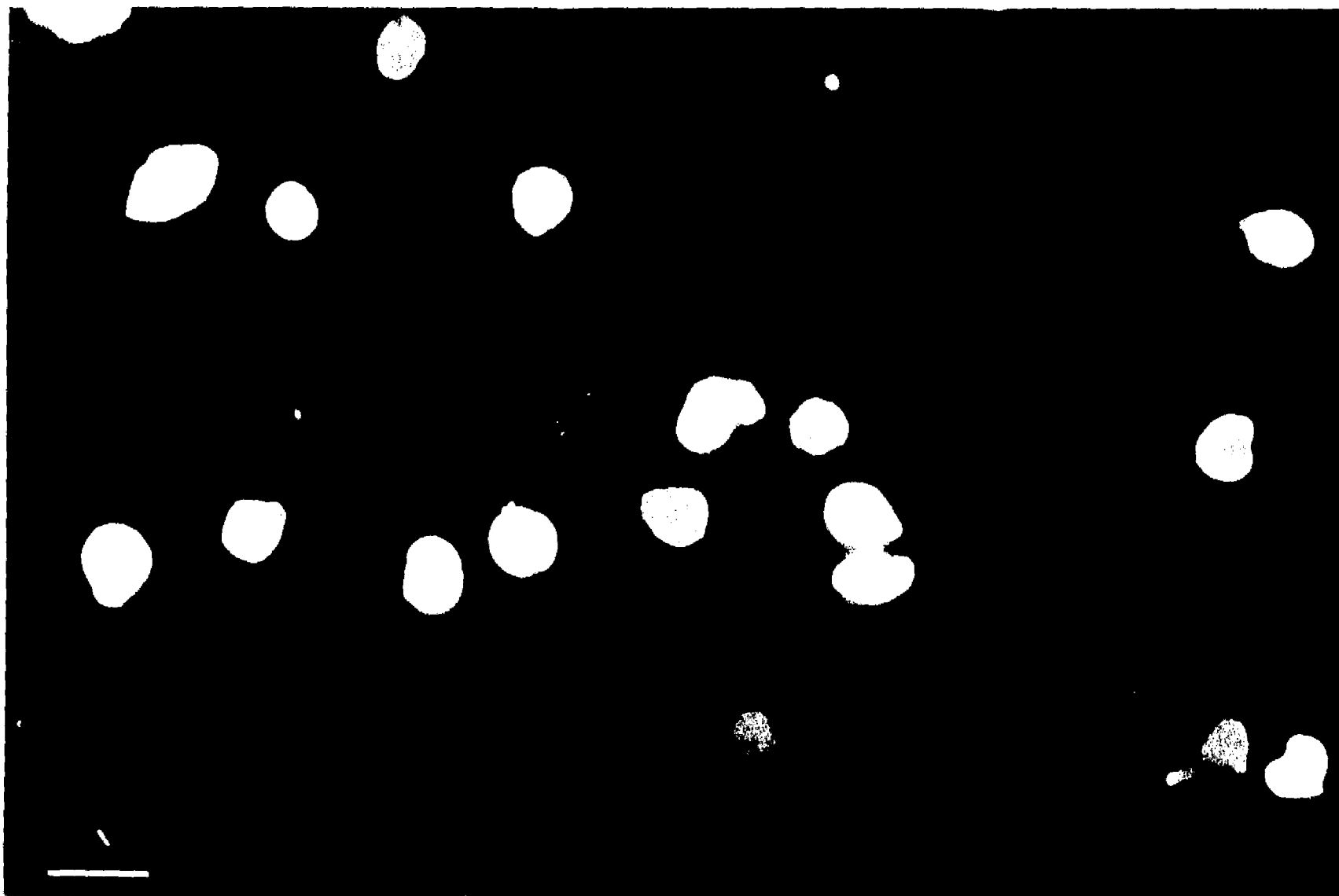


Fig. 6  
Inmunofluorescencia *in vitro* de trofozoitos de *E.*  
*histolytica* teñidos con el mAb 4D-6.

En la figura 6A se observa que hay mucha heterogeneidad en la tinción de los trofozoitos, lo que no está relacionado con el tamaño de la amiba. Esto posiblemente indica que hay diferencias cuantitativas de la proteinasa en los trofozoitos. En la figura 6B, de mayor aumento, se observa el fenómeno de "parche" (capping).

Barra: 25  $\mu$ m.

FIG. 6A



FALLA DE ORIGEN

FIG. 6B



FALLA DE ORIGEN

Fig. 7  
Inmunoperoxidasa in vivo de trofozoitos de *E. histolytica*  
con el mAb en un absceso hepático amibiano experimental en  
el hamster.

Se observan amibas en los abscesos hepáticos de 6 horas de  
evolución. En la figura 7A se encuentra una amiba  
intensamente teñida, rodeada de leucocitos  
polimorfonucleares. Se observa la focalización de la  
tinción en algunas áreas de la amiba (ver flechas), lo cual  
se puede detectar con mayor precisión utilizando  
microscopía de Nomarski (Fig. 7B). También se observa  
tinción de la peroxidasa endógena de eritrocitos  
localizados en los abscesos.

Barra: 40  $\mu\text{m}$ .

FIG. 7A

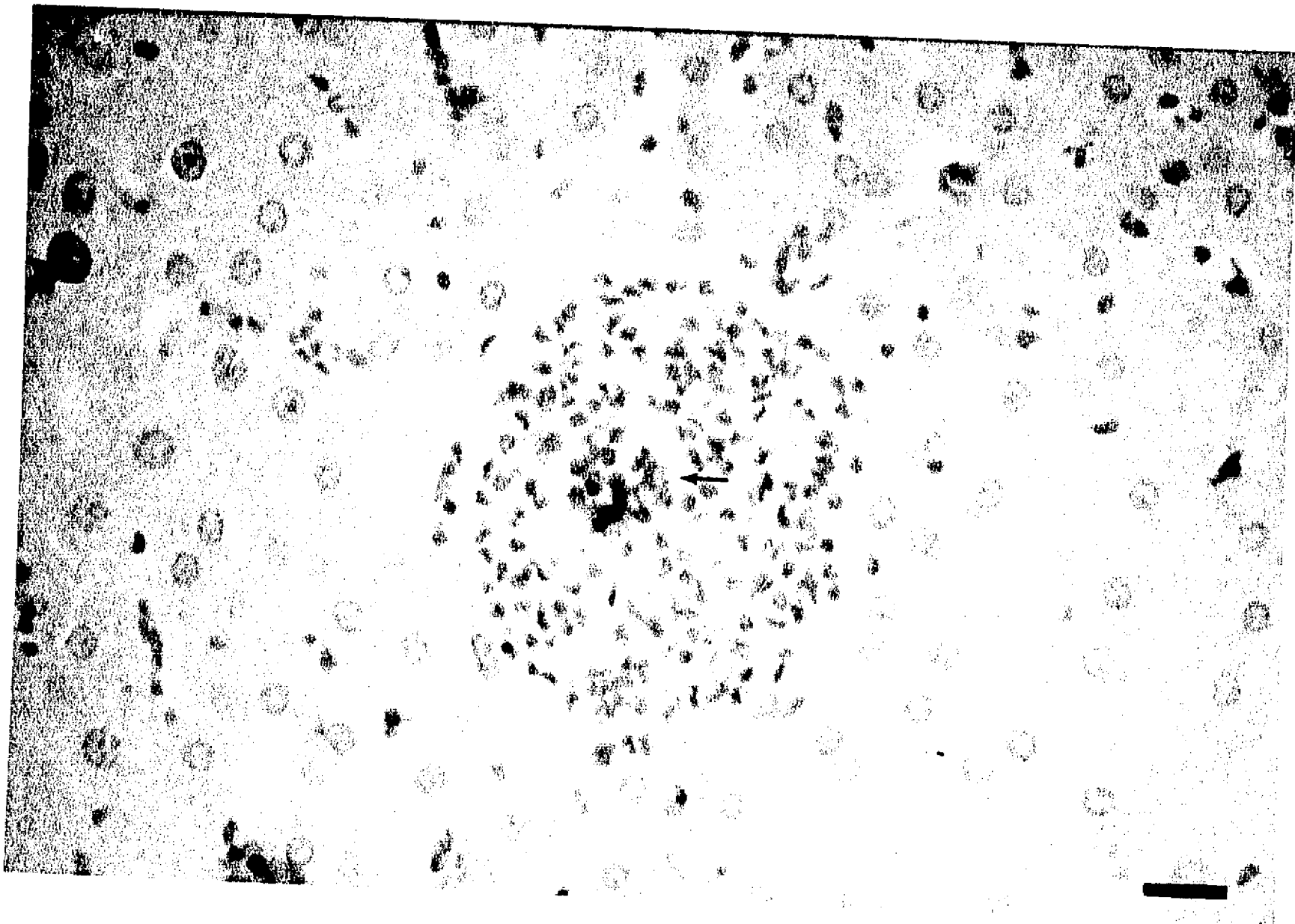
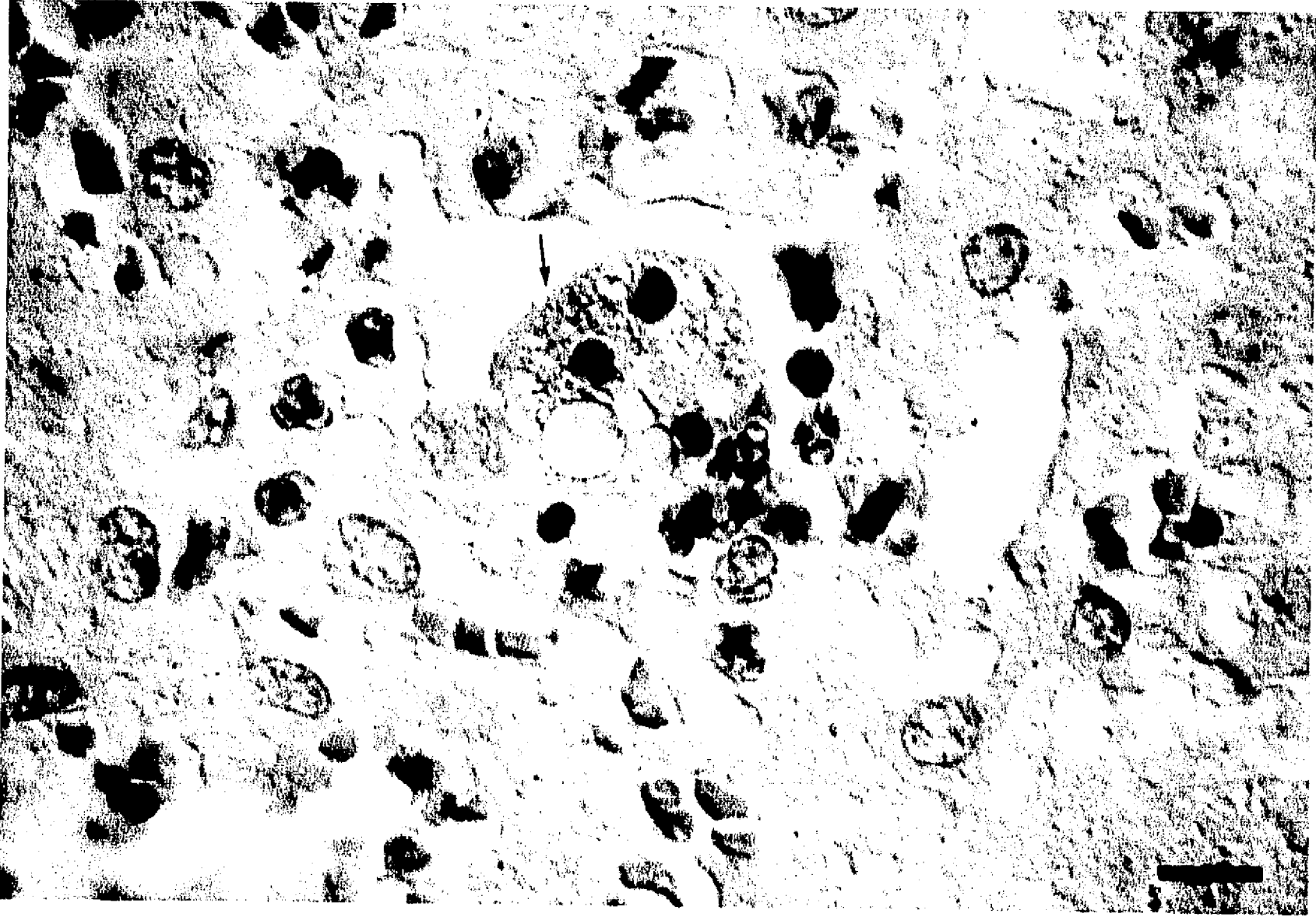


FIG. 7B



FALLA DE ORIGEN



**Figs. 8**

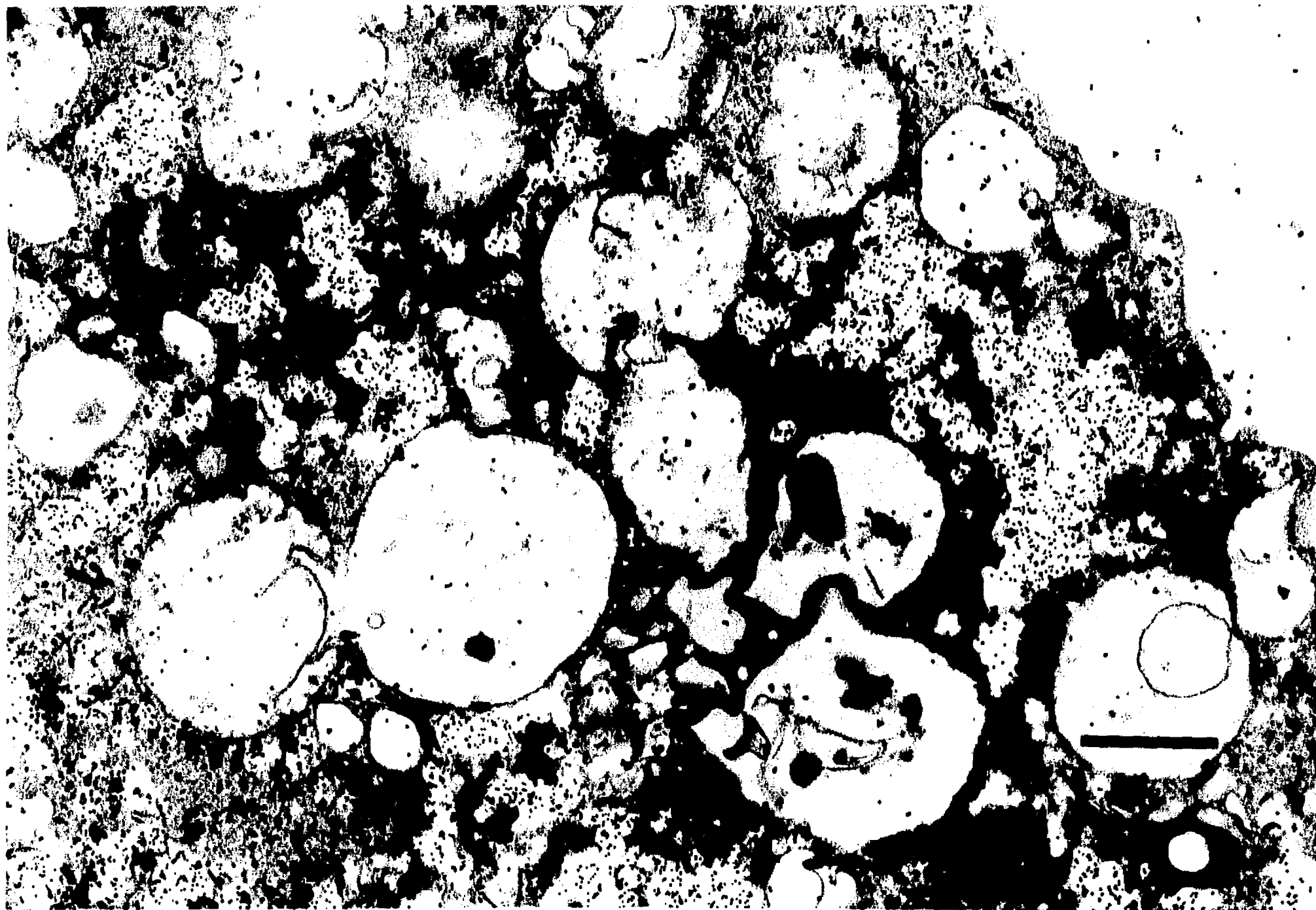
Localización del antígeno reconocido por el mAb 4D-6 por microscopía electrónica.

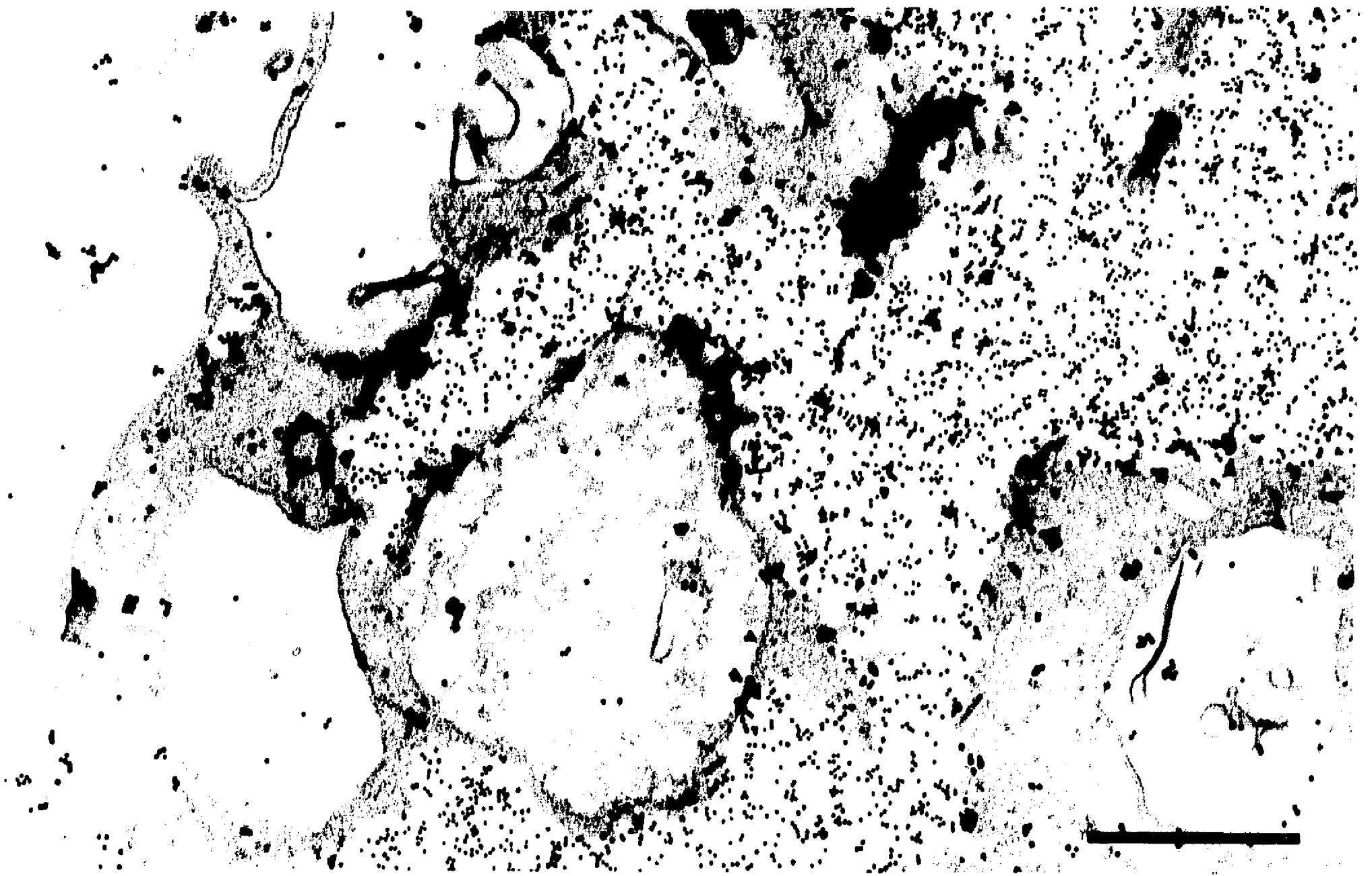
Las figuras 8A, 8B y 8C corresponden a una vista parcial de un trofozoito. Las partículas de oro se localizan predominantemente en zonas claras, amorfas del citoplasma. Estas zonas claras frecuentemente se encuentran en la cercanía de vesículas. La figura 8D muestra un mayor aumento de la zona amorfa con una localización preferencial de las partículas de oro y con "gránulos" blancos redondos dentro de estas zonas translúcidas para electrones. La figura 8E muestra una preparación del control, teñida con IgG control de ratón. Se observa una vista parcial de un trofozoito con muy escaso marcaje de inmuno-oro totalmente inespecífico.

Barras: 1µm

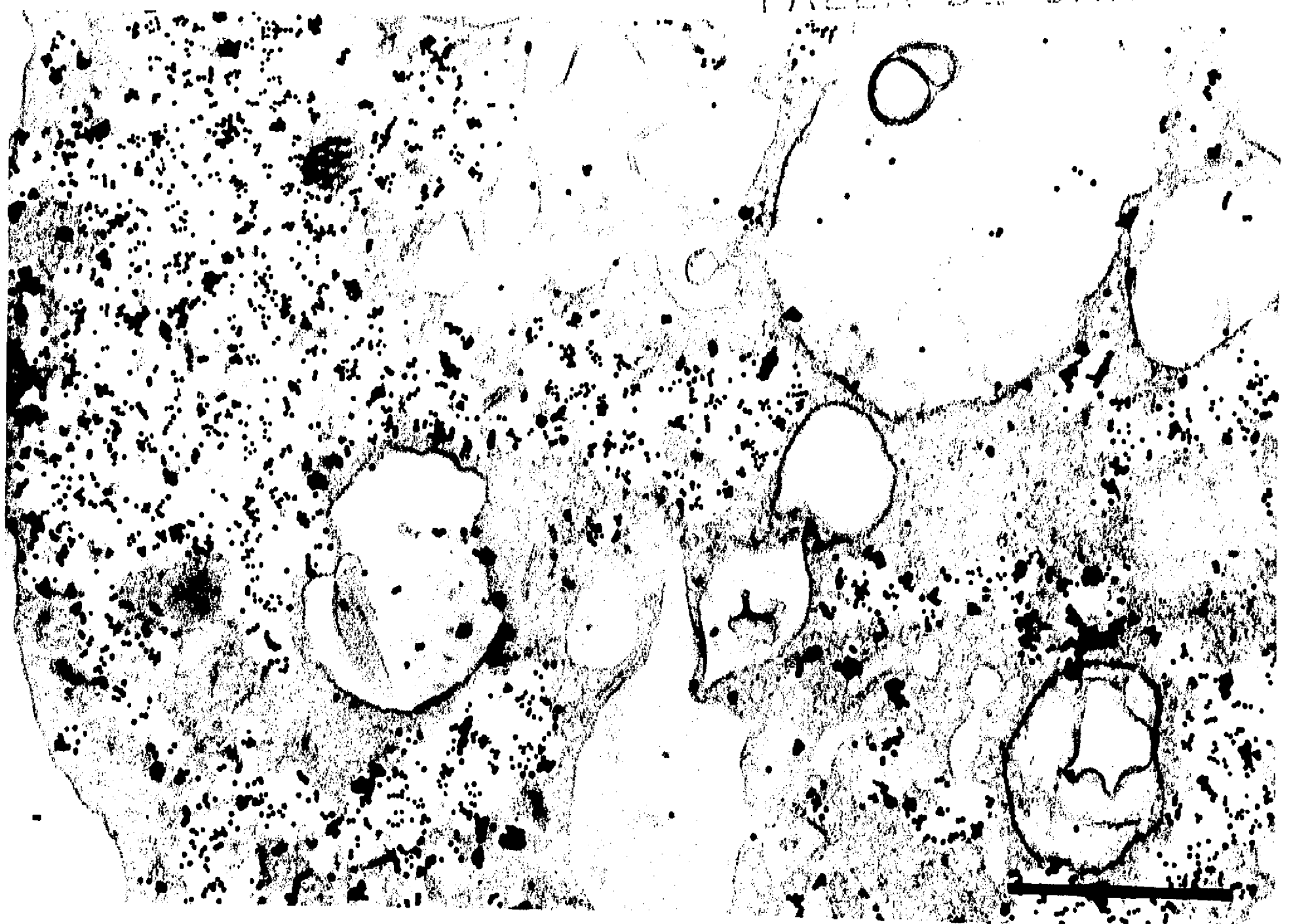
*Figura 8A - Trofozoito*

**FIG. 8A**





FALLA DE ORIGEN



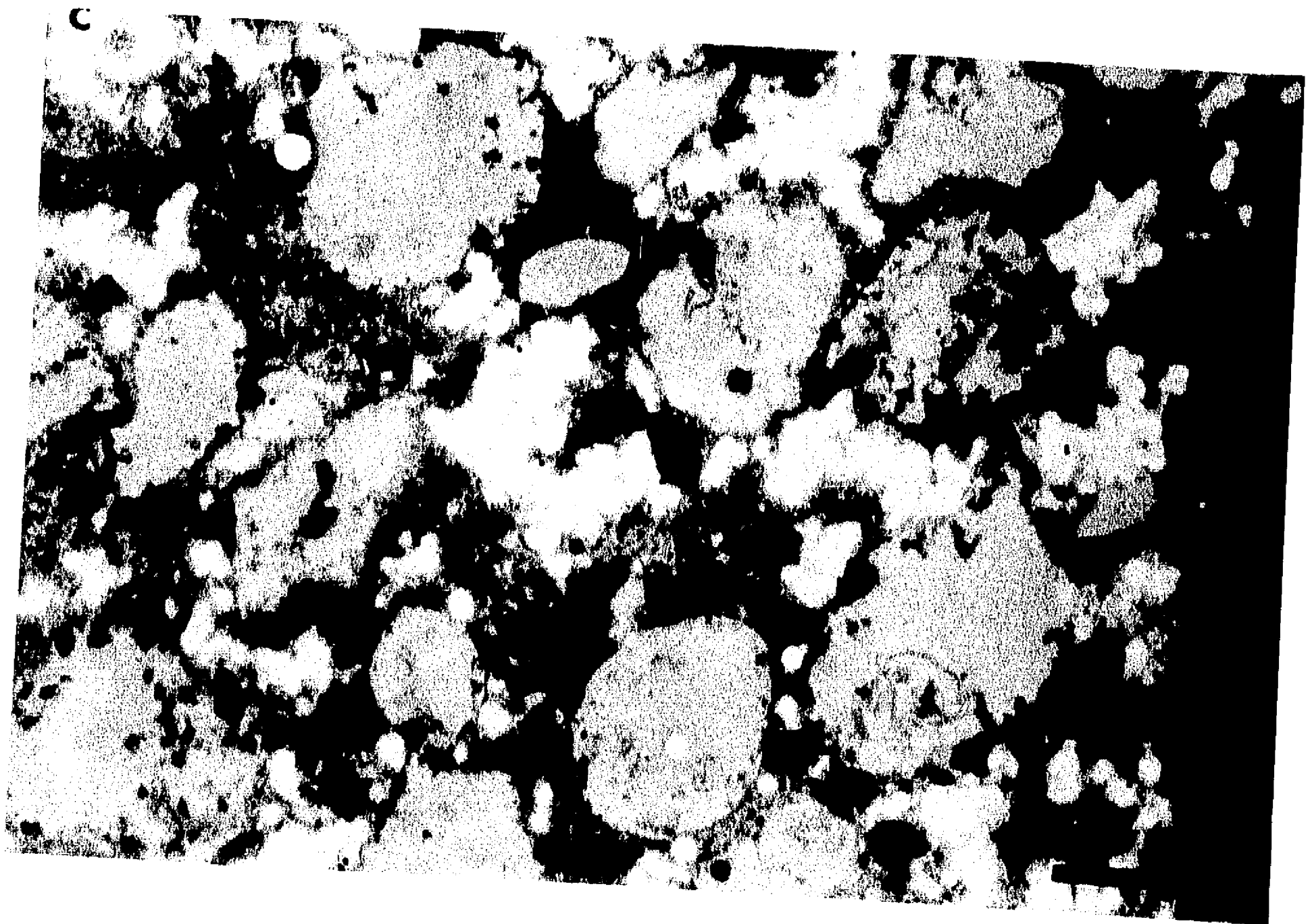
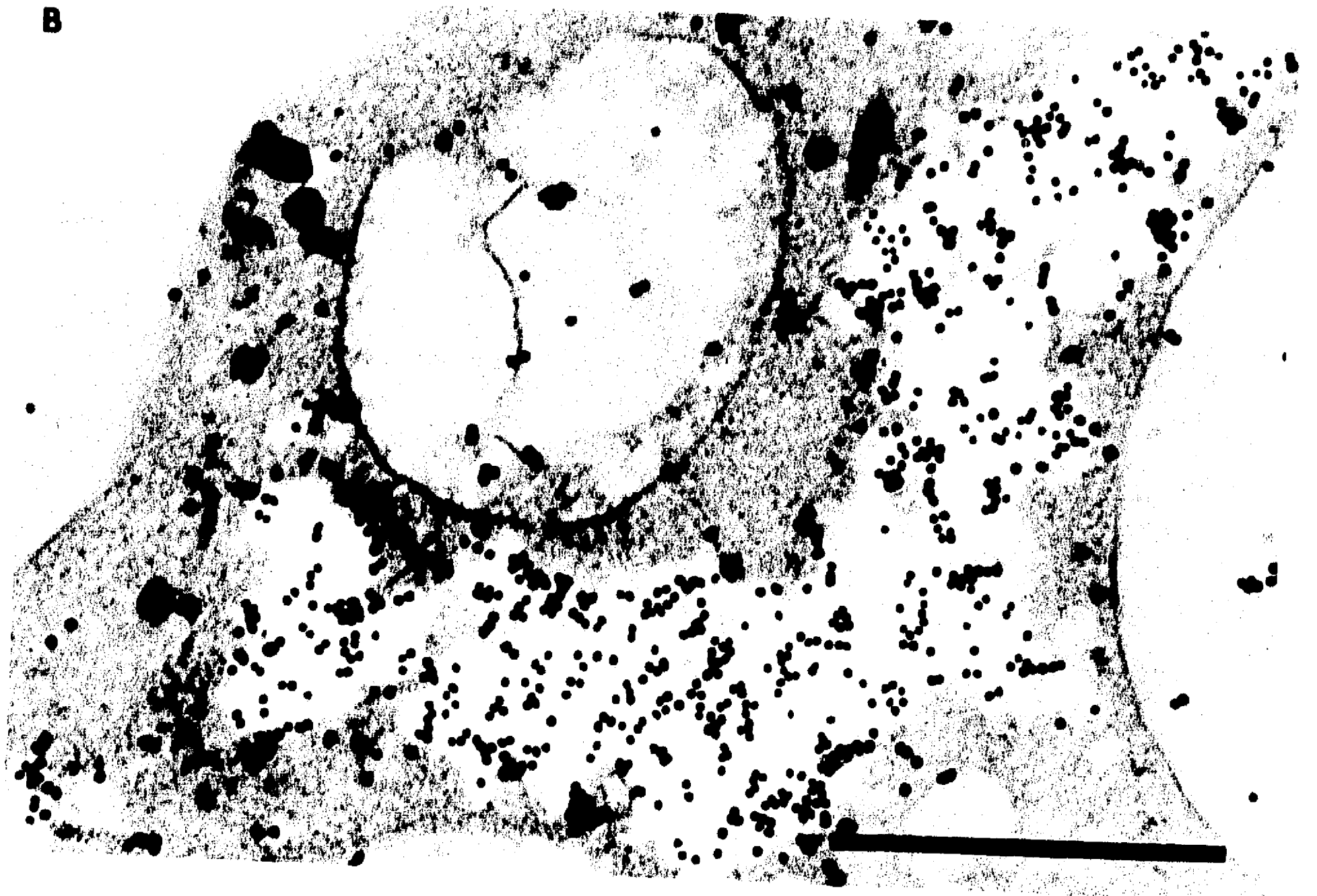
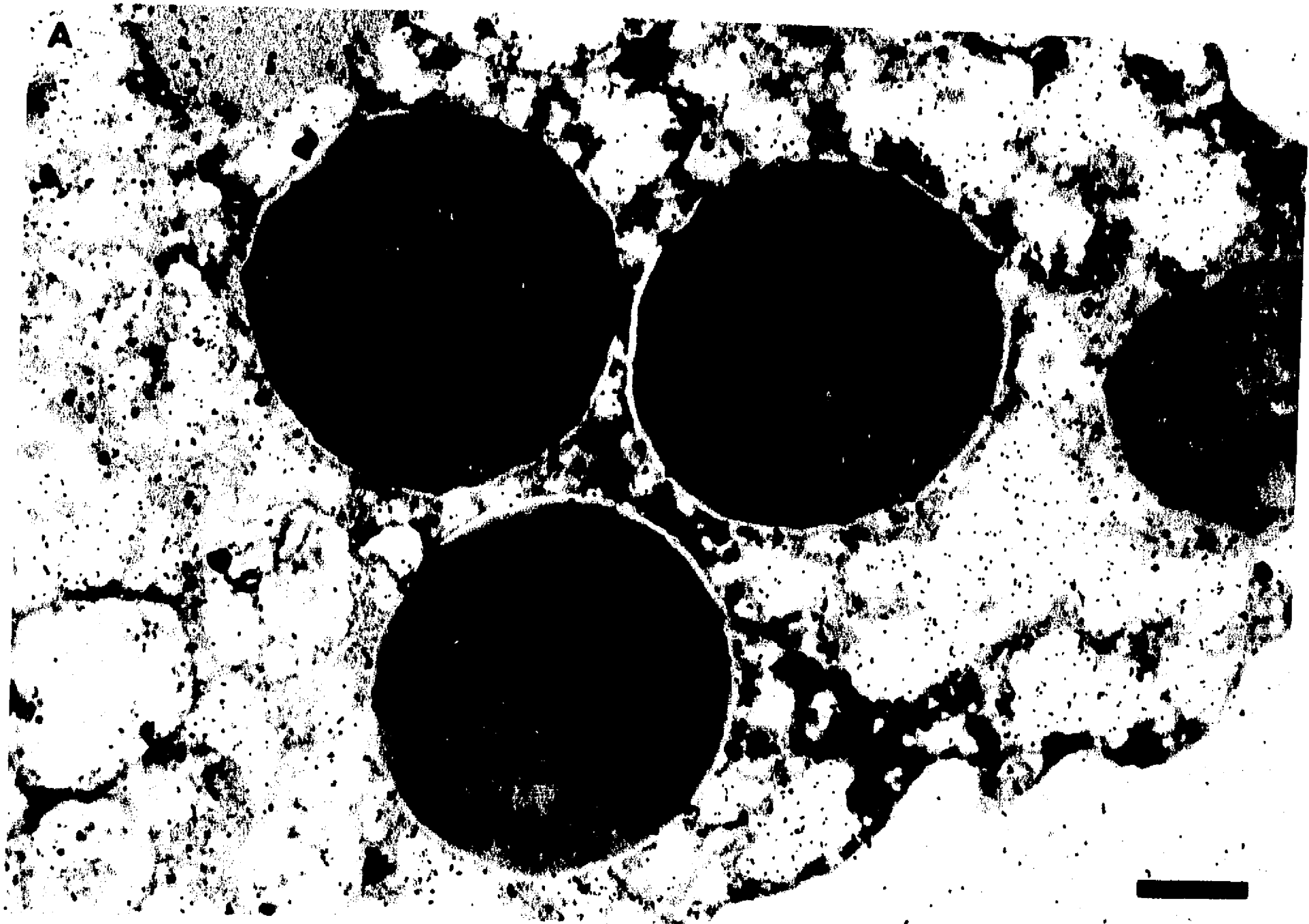


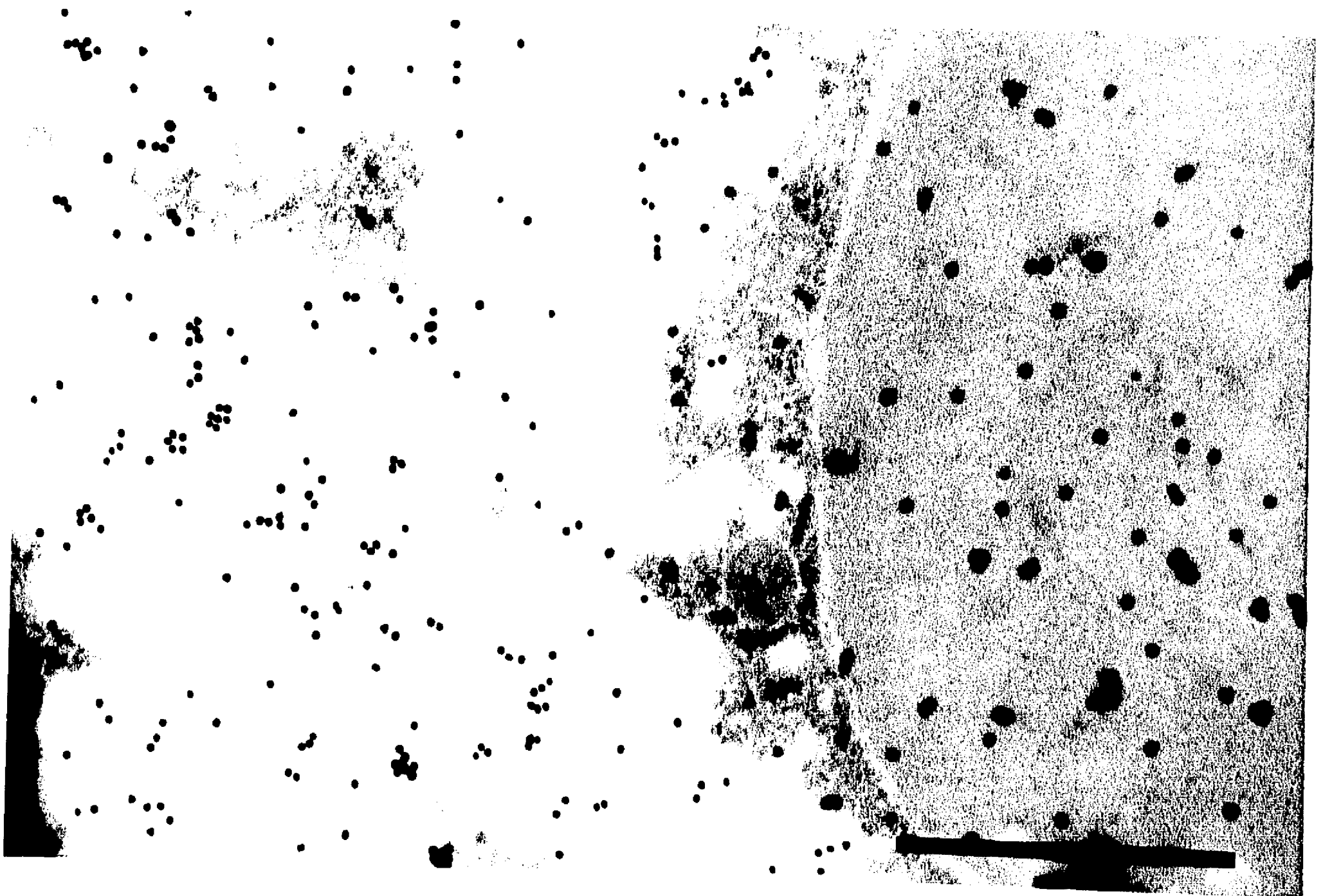
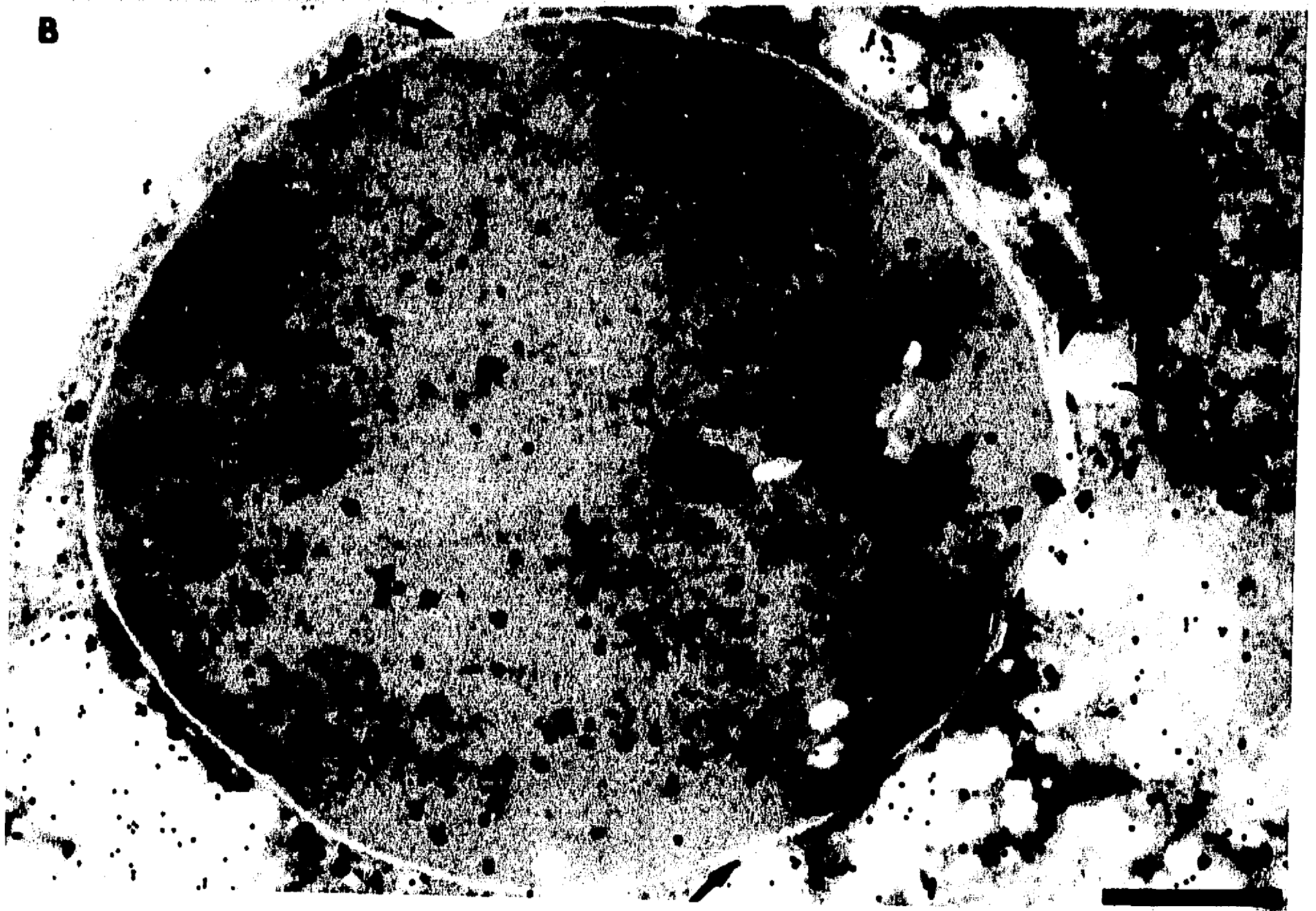
Fig.9  
Microscopía electrónica de la localización del antígeno  
reconocido por el mAb 4D-6 posterior a la  
eritrofagocitosis.

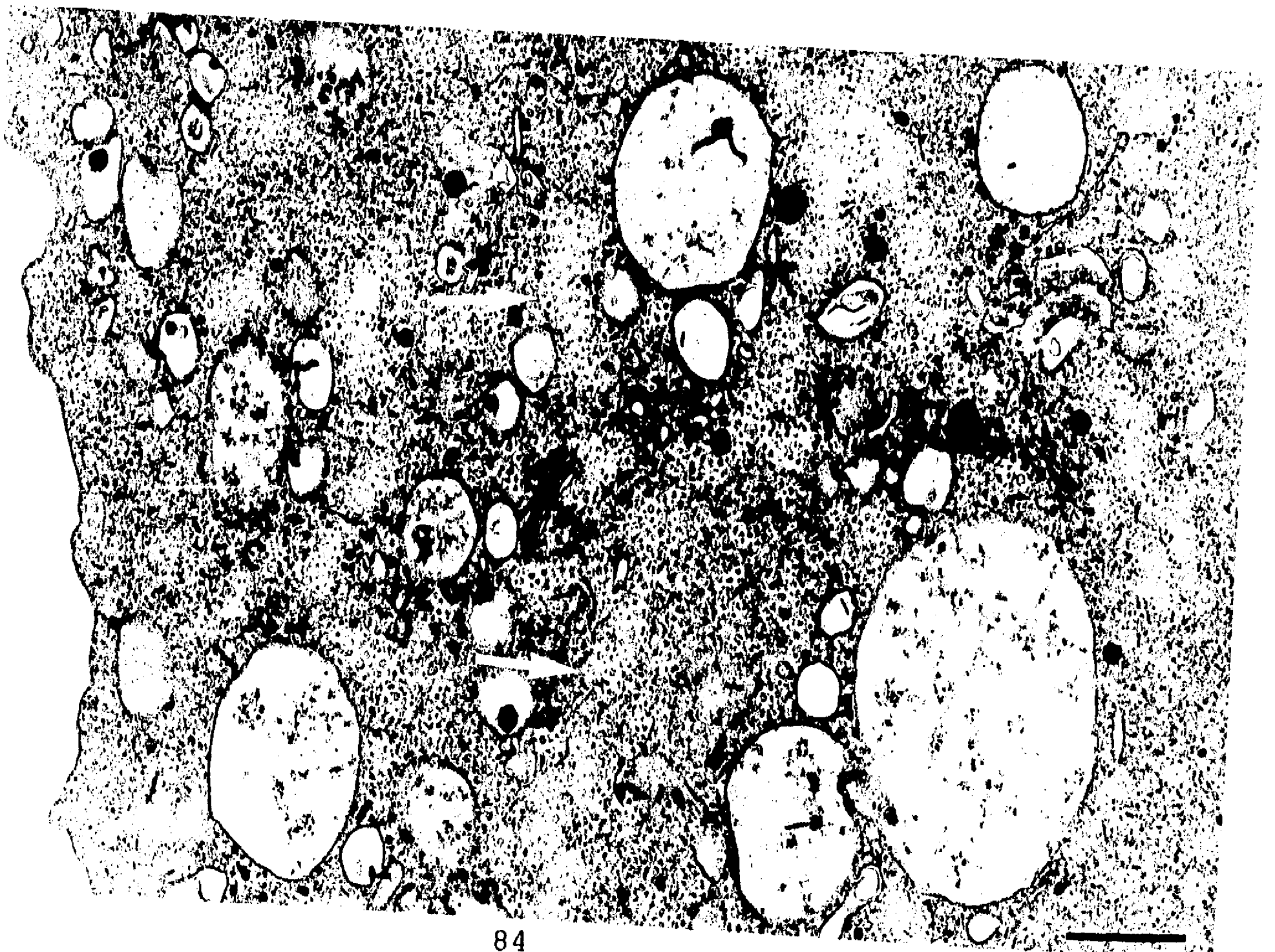
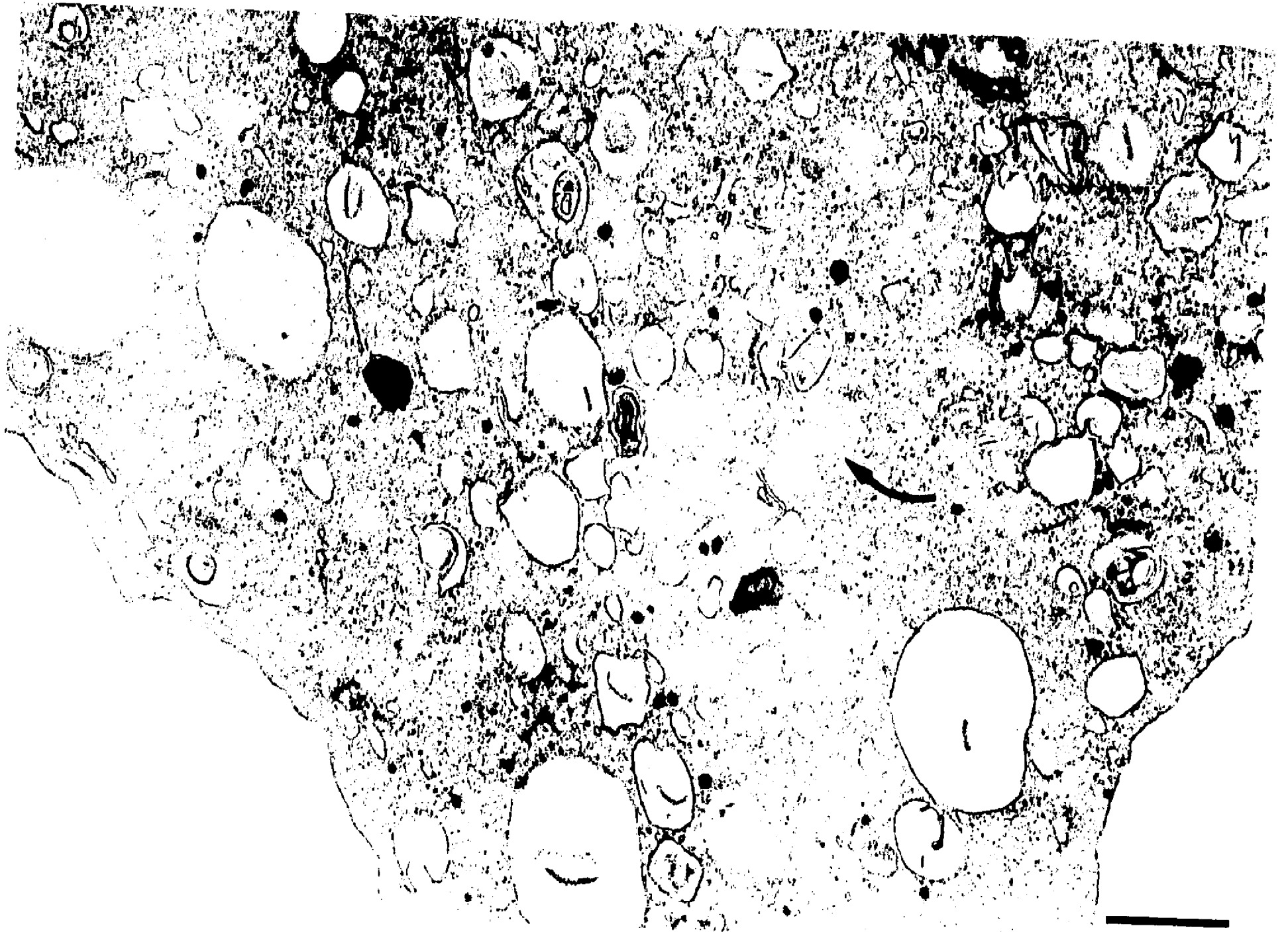
La figura 9A muestra una vista parcial de un trofozoito con  
cuatro eritrocitos. Las partículas de oro se observan  
principalmente en zonas claras amorfas y sobre eritrocitos.  
Las figuras 9B y 9C muestran un mayor aumento de un  
eritrocito fagocitado. Algunas zonas amorfas claras con el  
antígeno están en contacto con la membrana del eritrocito  
(ver flechas).

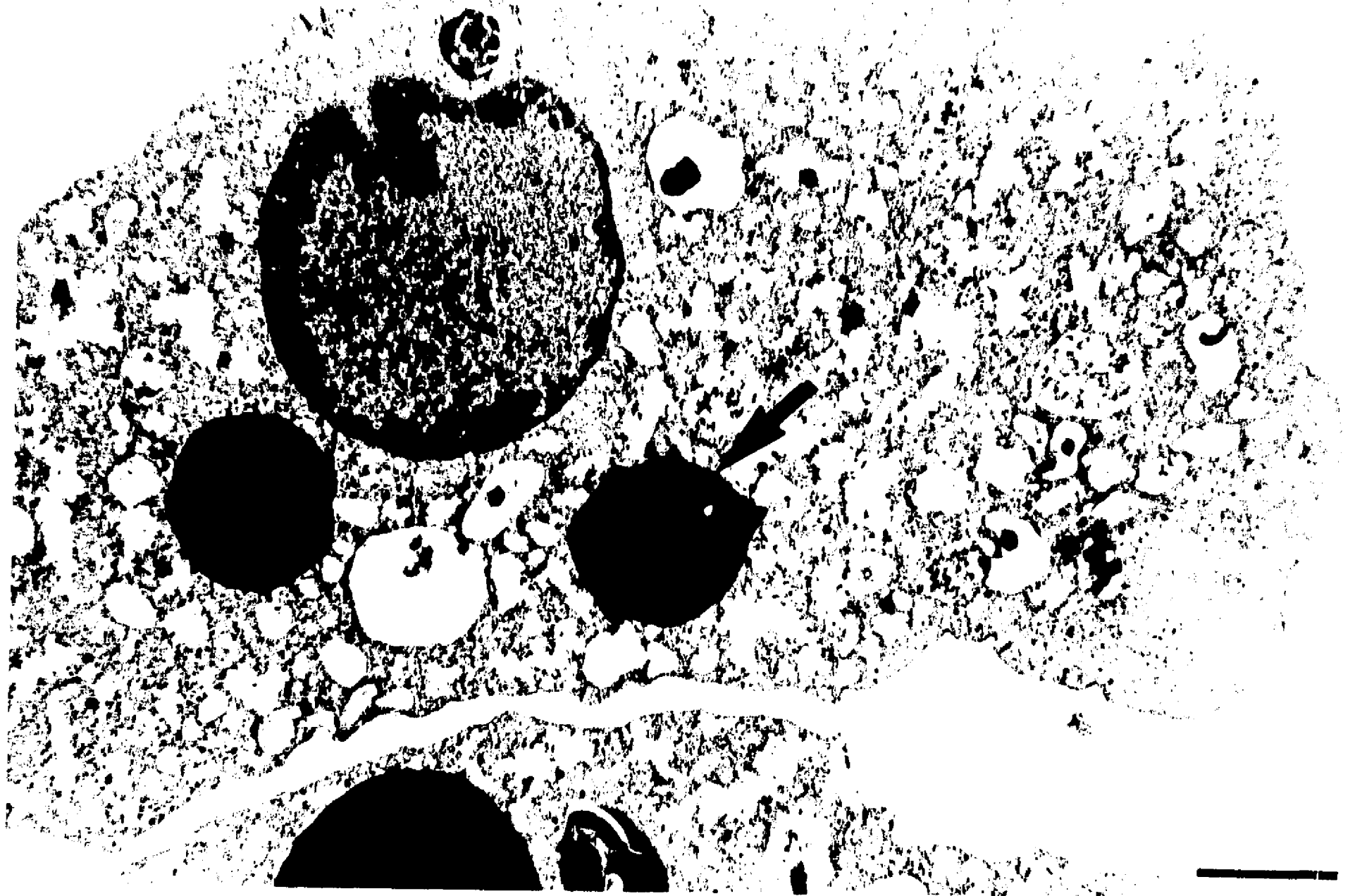
Barras: 1 $\mu$ m.

FIG.9A

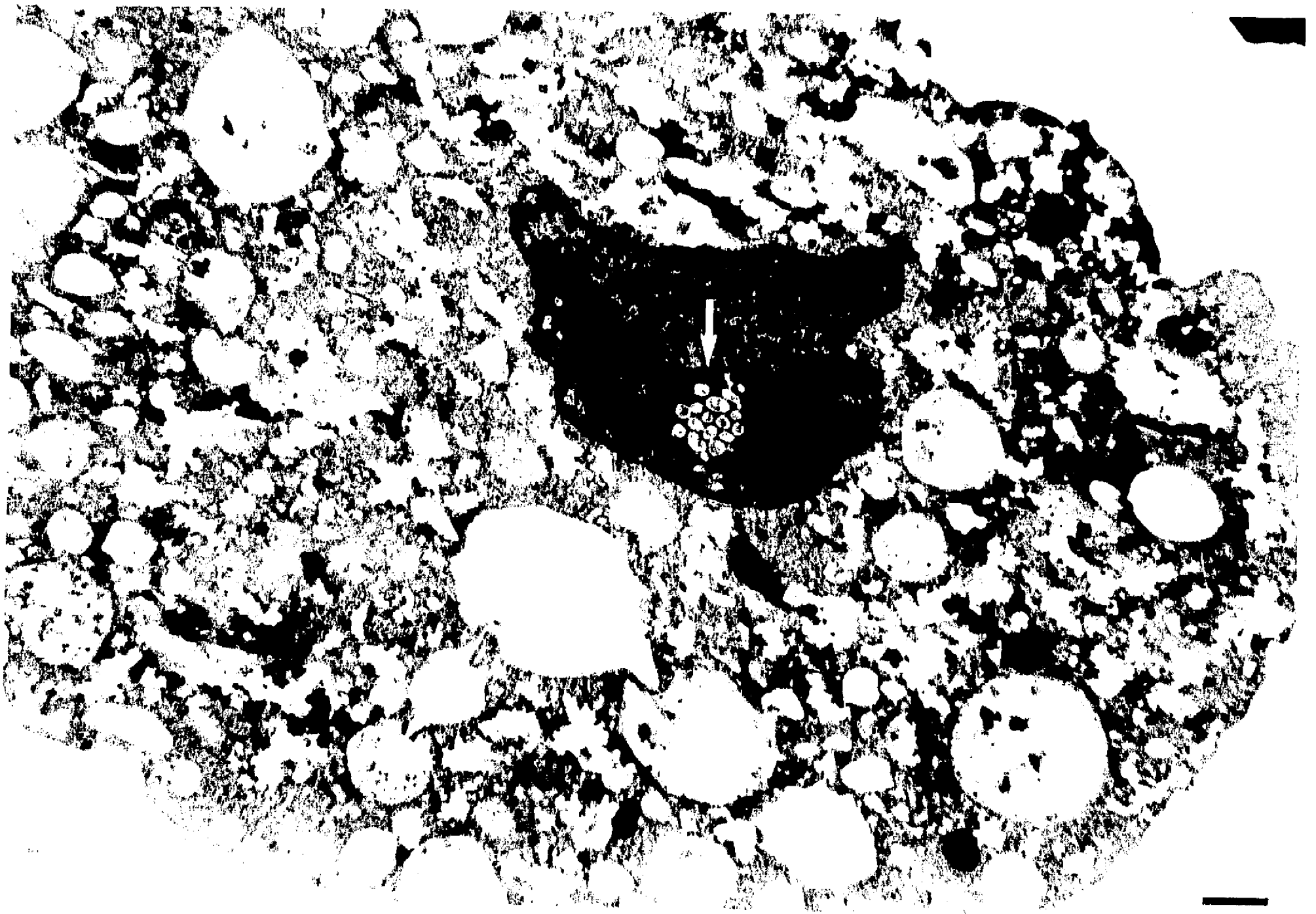




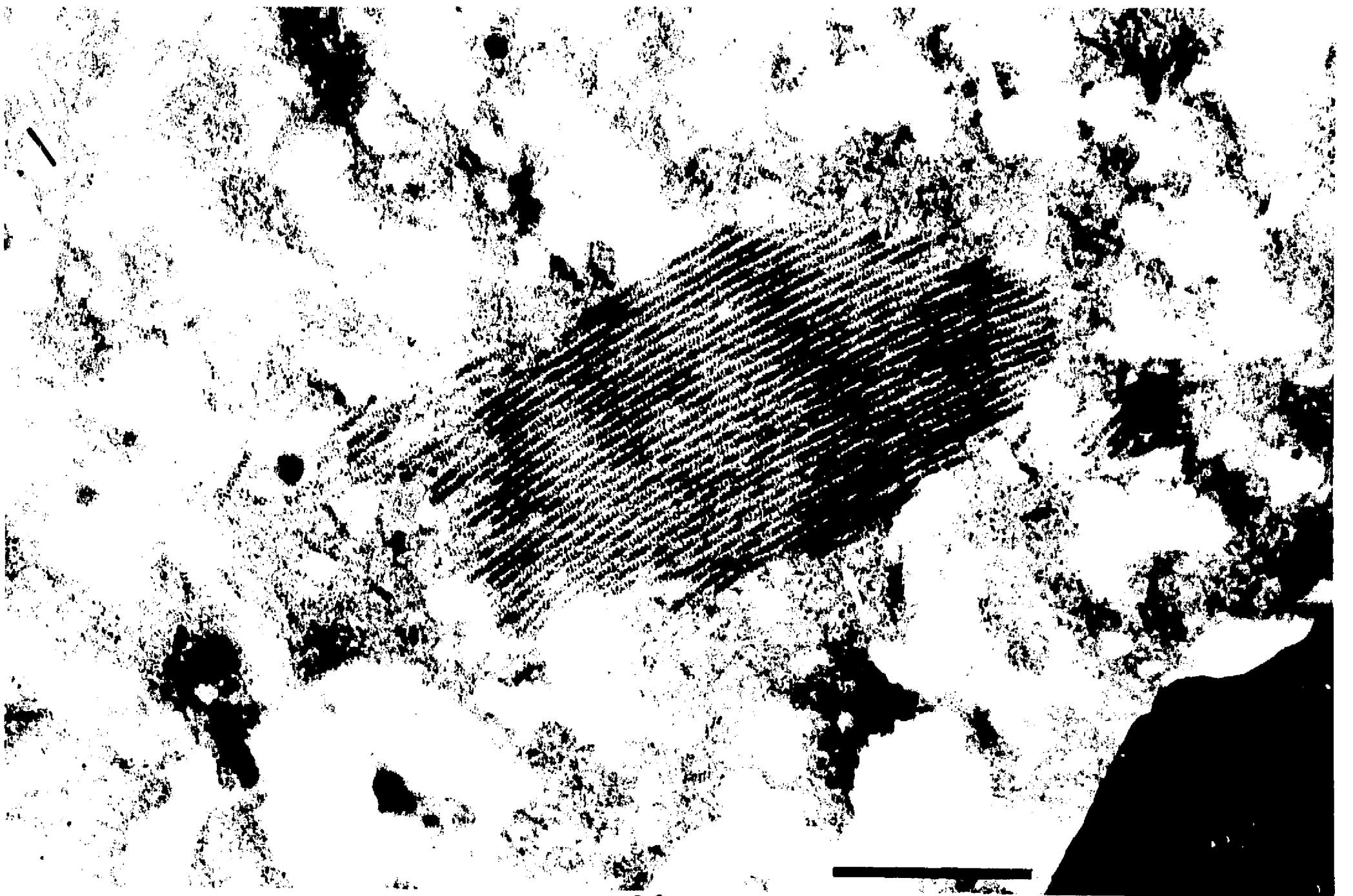
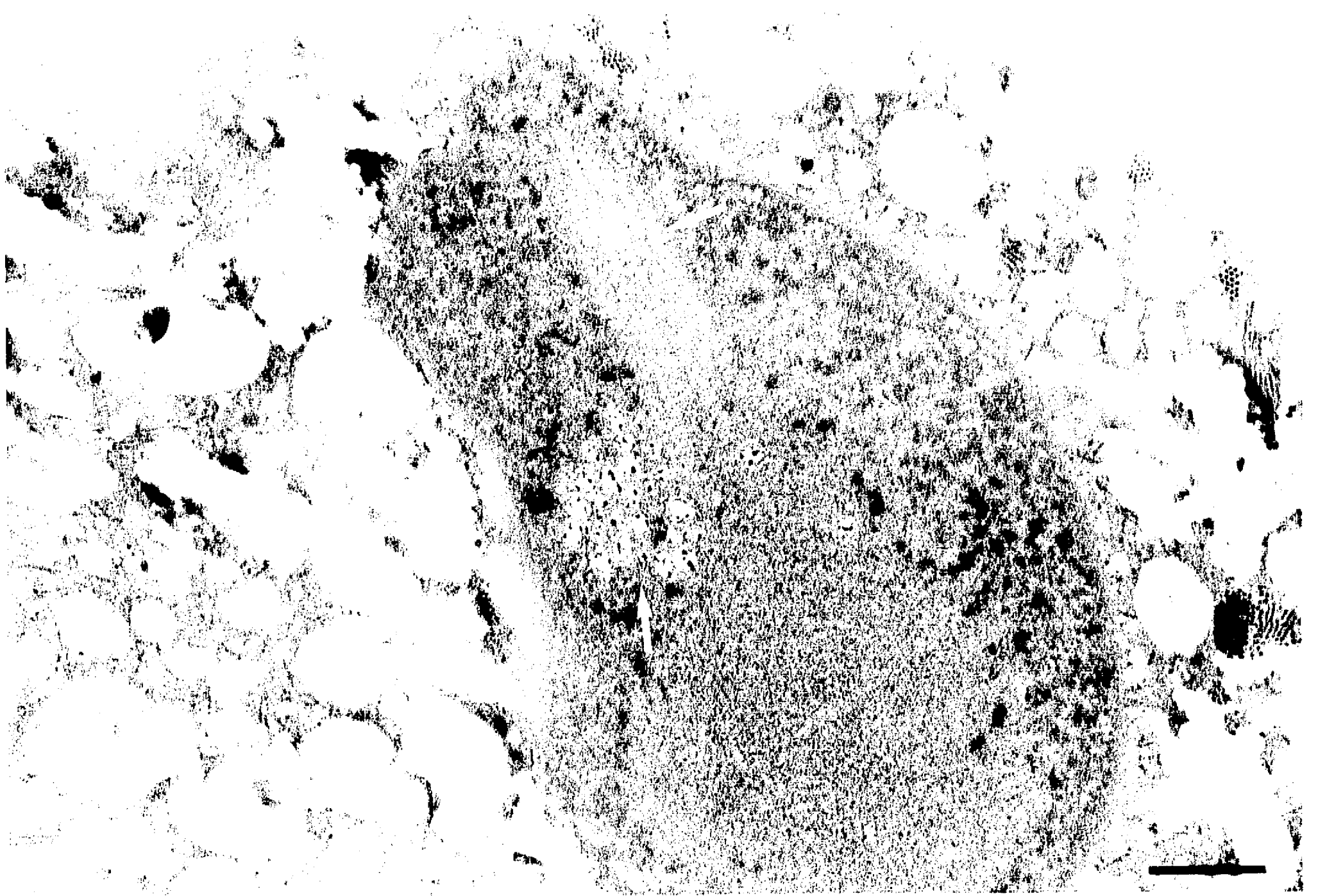




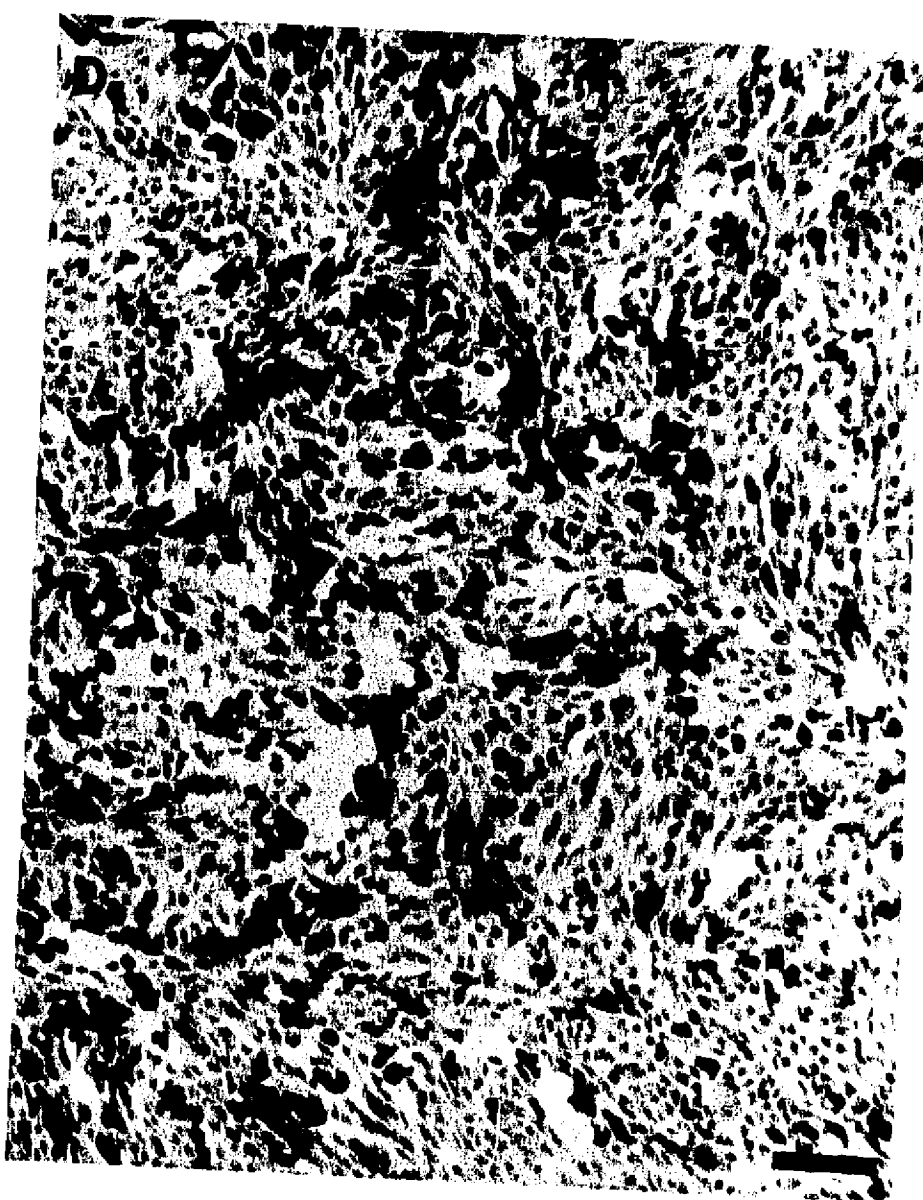
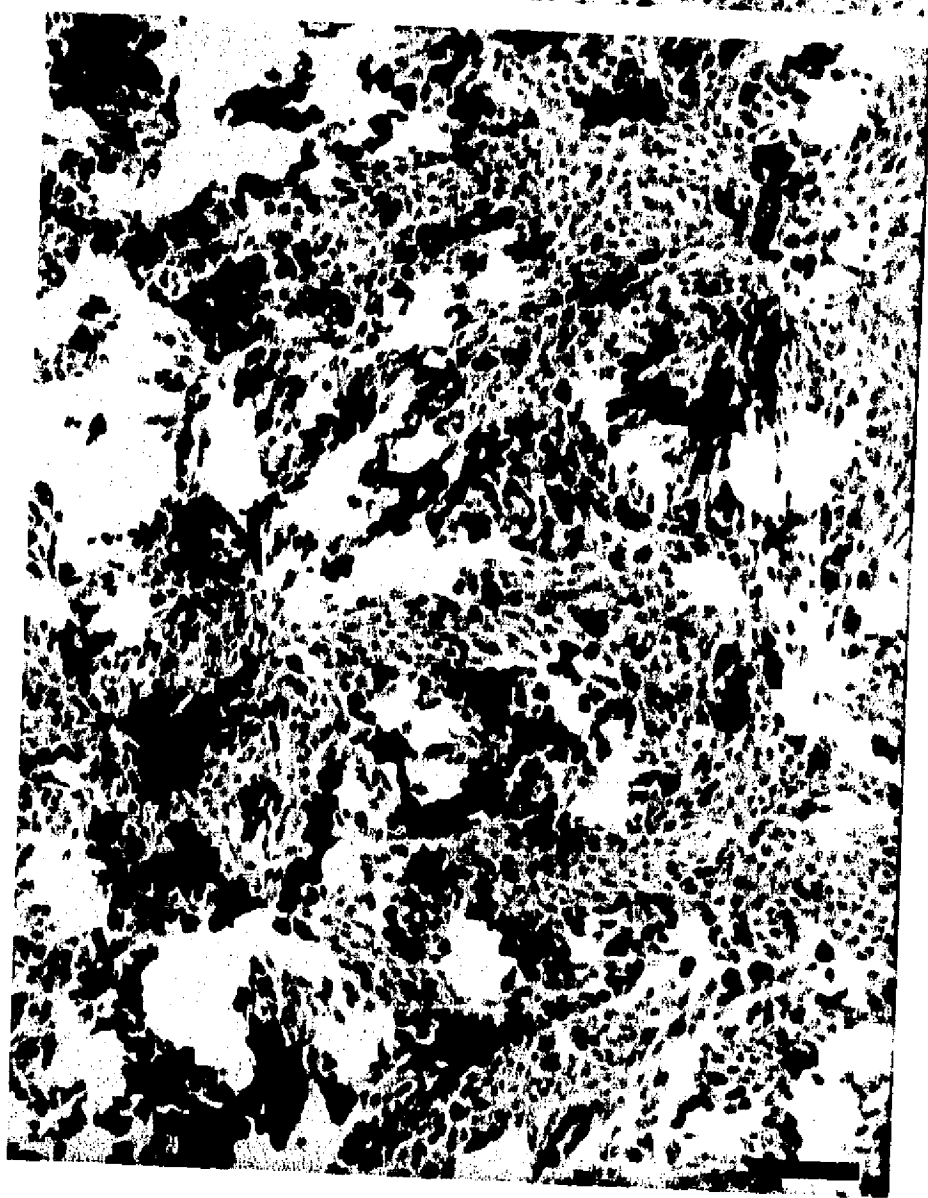
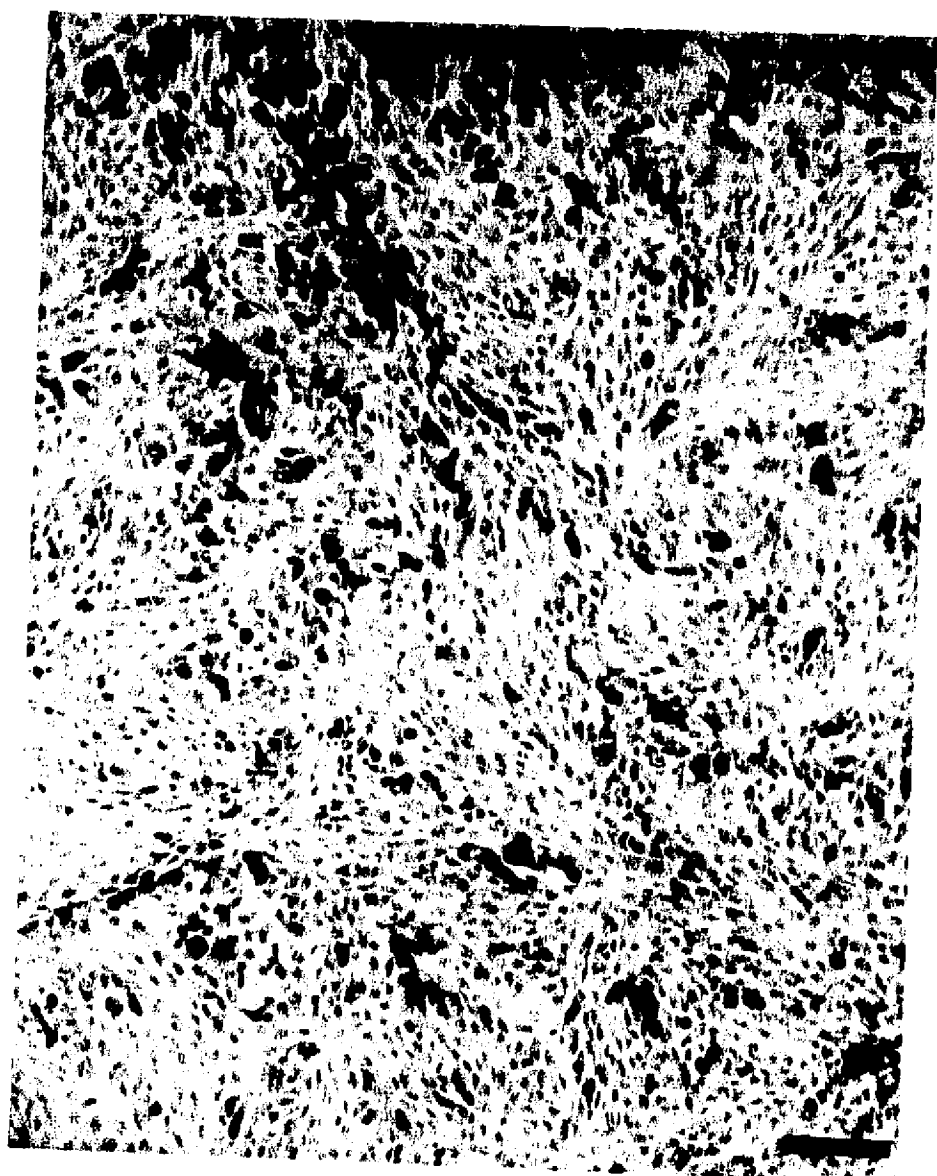
FALLA DE ORIGEN



FALLA DE ORIGEN







FALLA DE OXIGEN